

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ESSAIS
DE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE
DU LAPIN ET DU COBAYE
PAR L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE

par L. NÈGRE et A. BOQUET.

Dans un travail précédent, nous avons montré que l'injection intraveineuse de l'extrait méthylique de bacilles de Koch préalablement traités par l'acétone provoque, chez les lapins sains, l'apparition de sensibilisatrices spécifiques et augmente, chez les lapins tuberculeux, les anticorps développés au cours de l'infection.

Nous avons également indiqué que ces injections répétées d'antigène méthylique au lapin et au cobaye tuberculeux ont pour effet de ralentir la marche de l'infection qui reste souvent localisée à un seul organe.

Au contraire, les extraits acétoniques directs de bacilles de Koch, qui, par ailleurs, se comportent comme des antigènes médiocres *in vitro* et *in vivo*, n'exercent aucune action favorable dans le traitement de la tuberculose expérimentale des petits animaux de laboratoire. Souvent même, ils accélèrent l'évolution de la maladie et provoquent l'extension rapide des lésions.

Ces résultats nous ont incités à étudier de plus près l'action des lipoïdes bacillaires sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye et à préciser le rôle respectif des divers constituants du bacille de Koch dans les phénomènes observés.

ACTION DES DIVERS CONSTITUANTS DU BACILLE DE KOCH SUR L'ÉVOLUTION DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU LAPIN ET DU COBAYE.

Pour comparer l'action des lipoïdes de l'extrait méthylique avec celle des autres constituants du bacille de Koch, nous avons traité, en même temps, plusieurs lots d'animaux infectés le même jour et dans les mêmes conditions, respectivement avec :

- 1^o L'extrait acétonique direct de bacilles de Koch (graisses et cires).
- 2^o L'extrait méthylique de ces mêmes microbes préalablement traités par l'acétone (lipoïdes);
- 3^o Les corps bacillaires dégraissés par l'alcool méthylique dans l'appareil de Kumagawa (protéines);
- 4^o Une solution de tuberculine brute au 1/100 dans l'huile d'olive stérile.

Les extraits bacillaires, préparés suivant la technique que nous avons publiée (1), étaient débarrassés de l'acétone ou de l'alcool méthylique par distillation dans le vide, à la température de 50°, et émulsionnés dans un volume d'eau distillée égal au volume initial.

Expérience 1. — Plusieurs lots de lapins infectés par inoculation intraveineuse de 0 mgr. 001, de bacilles tuberculeux bovins, et de cobayes infectés par instillation oculaire de 0 mgr. 5 de ces mêmes microbes, ont reçu, *huit jours après l'inoculation*, et *deux fois par semaine* : les uns, des injections sous-cutanées de 1 cent. cube d'extrait méthylique de bacilles de Koch préalablement traités par l'acétone; d'autres, 1 cent. cube d'extrait acétonique correspondant, comme le précédent extrait, à 1 centigr. de bacilles secs; d'autres, 1 milligr. de corps bacillaires épuisés pendant douze heures par l'alcool méthylique dans l'appareil de Kumagawa, et une dernière série, 1 cent. cube de solution huileuse au 1/100 de tuberculine brute.

Lapins. — Les lapins traités par l'antigène méthylique sont morts les cent

(1) Ces *Annales*, 35, mai 1921, p. 300.

cinquième, cent trente-cinquième, cent-quatre-vingt-quinzième et deux cent soixante-dixième jours après l'infection, de tuberculose pulmonaire non confluente, sans autres lésions.

Ceux traités par l'extrait acétonique sont morts :

Le premier, le quarante-cinquième jour, de tuberculose pulmonaire confluente.!

Le deuxième, le soixantième jour, de tuberculose pulmonaire confluente. Le troisième, le soixante-quinzième jour, de tuberculose pulmonaire confluente.

Le quatrième, le soixante-quinzième jour, de tuberculose généralisée.

Les lapins traités avec les bacilles dégraissés sont morts :

Le premier, le soixante-quinzième jour, de tuberculose pulmonaire confluente.

Le deuxième, le quatre-vingt-dixième jour, de tuberculose pulmonaire confluente et tuberculose rénale.

Le troisième, le cent cinquième jour, de tuberculose pulmonaire confluente et de tuberculose rénale.!

Le quatrième, le cent cinquième jour, de tuberculose généralisée.

Les témoins sont morts :

Le premier, le soixantième jour, de tuberculose pulmonaire confluente.

Le deuxième, le soixante-quinzième jour, de tuberculose pulmonaire confluente et rénale.

Le troisième, le quatre-vingt-dixième jour, de tuberculose pulmonaire confluente et de tuberculose rénale.

Le quatrième, le cent cinquième jour, de tuberculose pulmonaire confluente et de tuberculose rénale.

Cobayes. — Les cobayes traités par l'antigène méthylique sont morts :

Le premier, le soixante-quinzième jour, de tuberculose généralisée.

Le deuxième, le soixante-quinzième jour avec des lésions tuberculeuses de la rate.

Le troisième, le cent cinquième jour, de tuberculose généralisée.

Le quatrième, le cent vingtième jour avec des lésions tuberculeuses de la rate.

Le cinquième, le cent vingtième jour, de tuberculose généralisée.

Le sixième, le cent trente-cinquième jour, de tuberculose généralisée.

Le septième, le cent cinquantième jour, de tuberculose pulmonaire.

Le huitième, le cent quatre-vingt-quinzième jour, de tuberculose pulmonaire.

Ceux traités par l'extrait acétonique sont morts :

Quatre du quarante-cinquième au soixantième jour avec des lésions tuberculeuses de la rate.

Six du soixante-quinzième au cent cinquième jour, de tuberculose généralisée.

Les cobayes traités par la tuberculine sont morts du soixante-quinzième au cent vingtième jour, de tuberculose généralisée et les témoins du quatre-vingt-dixième au cent cinquième jour, de tuberculose généralisée.

Il ressort de ces expériences, que la plupart des animaux traités par l'extrait méthylique antigène ont survécu de un à cinq mois aux témoins, en se maintenant en bon état jusque dans les dernières périodes de leur maladie. Les cobayes présentaient

dans la moitié des cas des lésions localisées aux ganglions lymphatiques et à la rate, et les lapins, des tubercules pulmonaires moins conflents que chez les témoins. Dans les autres organes exceptionnellement atteints, on trouvait parfois des lésions en voie de sclérose.

La tuberculine et les corps bacillaires dégraissés se sont montrés sans effet sur l'évolution de la tuberculose des animaux de laboratoire qui sont morts dans les mêmes délais et avec les mêmes lésions que les témoins.

Quant aux graisses et aux cires bacillaires solubles dans l'acétone, elles ont accéléré l'extension de la tuberculose à tous les organes, aux reins en particulier.

INFLUENCE DE LA SOLUBILISATION PARTIELLE DES GRAISSES BACILLAIREES
PAR L'ACÉTONE AVANT L'EXTRACTION DES LIPOÏDES PAR L'ALCOOL
MÉTHYLIQUE.

L'action nuisible des graisses et des cires bacillaires sur la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye étant ainsi établie, nous avons recherché dans quelle mesure l'extraction préalable plus ou moins complète de ces substances modifie les propriétés de l'extrait méthylique.

60 grammes de corps microbiens desséchés provenant de cultures en bouillon glycériné (âgées de six semaines) de bactéries humaines et bovines, en parties égales, sont divisés en quatre lots de 15 grammes.

Un premier lot A est épuisé pendant vingt-quatre heures par l'acétone, un deuxième lot B pendant quarante-huit heures ; un troisième lot C pendant cinq jours ; un quatrième lot D pendant dix jours.

Puis, l'acétone ayant été éliminé, chacun de ces lots de bactéries est additionné d'alcool méthylique et laissé en contact avec celui-ci pendant dix jours.

Expérience II. — 4 lots de 4 lapins, A, B, C et D infectés par inoculation intraveineuse de 0 mgr. 001 de bactéries bovines, ont été traités, deux fois par semaine, par des injections sous-cutanées de 1 cent. cube de l'antigène correspondant. Le traitement a été commencé huit jours après l'inoculation virulente.

2 lapins infectés en même temps et dans les mêmes conditions ont été gardés comme témoins.

Les lapins du lot A sont morts les cinquante-quatrième, cent sixième, cent vingt-sixième jours, les derniers de tuberculose généralisée.

Des lapins du lot B, un est mort de pasteurellose le cent sixième jour avec quelques rares tubercules pulmonaires, et un second, le cent soixantequinzième jour avec des lésions pulmonaires confluentes. Les deux autres survivent.

Les lapins du lot C sont en bon état, excepté un mort le cent vingt-sixième jour avec des lésions pulmonaires.

Dans le lot D, trois lapins sont morts de pasterurellose les cinquante-quatrième, quatre-vingt-quatorzième et cent quatorzième jours avec quelques granulations disséminées sur les poumons. Le quatrième survit.

Deux témoins sont morts les cent deuxième et cent sixième jours de tuberculose généralisée aux poumons, à la rate et aux reins.

La durée de l'extraction acétonique préalable joue un rôle considérable dans la valeur de l'antigène. Celui-ci se montre d'autant plus efficace qu'il renferme moins de substances cirograsseuses bacillaires. Le temps de contact avec l'acétone doit être au moins de cinq jours.

INFLUENCE DE LA VOIE D'INTRODUCTION DE L'ANTIGÈNE.

Chez le cobaye tuberculeux, ainsi que nous l'avons déjà montré (1), les injections intrapéritonéales d'antigène donnent des résultats de beaucoup supérieurs à ceux qu'on obtient par la voie sous-cutanée : survie plus longue et localisation plus nette des lésions sur un seul organe, la rate en particulier.

Le lapin tuberculeux supporte parfaitement de fortes doses d'antigène injectées par la voie veineuse. On note seulement, au cours des heures qui suivent, une faible réaction thermique qui atteint, pour 5 cent. cubes, 1° environ dans la moitié des cas. Les résultats de ces injections intraveineuses ont été les suivants :

Expérience III. — Cinq lapins sont infectés par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 004 de bacilles bovins.

Les quatrième et huitième jours après l'infection, ils reçoivent 5 cent. cubes d'antigène méthylique dans la veine.

Les vingt-quatrième, trente-huitième, cinquante-troisième jours, injection intraveineuse de 1 cent. cube d'antigène.

Les soixante-dix-septième, quatre-vingt-dixième, cent quatorzième jours, injection intraveineuse de 1/10^e de cent. cube d'antigène.

(1) Ces *Annales*, 37, septembre, p. 800.

Un lapin meurt le quarante-neuvième jour avec deux ou trois petits tubercules localisés à la base de chaque poumon.

Le deuxième lapin meurt le cinquante-septième jour avec quelques tubercules isolés sur les poumons. Pas d'autres lésions.

Le troisième lapin meurt le cent vingt-neuvième jour avec des lésions confluentes sur les poumons.

Le quatrième lapin meurt le cent cinquante-deuxième jour avec un poumon indemne et une dizaine de tubercules sur l'autre poumon. Pas d'autres lésions.

Le cinquième lapin est sacrifié le même jour en très bon état. Il ne présentait que trois ou quatre nodules pulmonaires. Pas d'autres lésions.

Trois lapins témoins sont morts les cinquante-deuxième, soixante et onzième et soixante-treizième jours avec des lésions tuberculeuses généralisées.

Bien que les injections intraveineuses d'antigène aient été très espacées, ces résultats sont analogues à ceux qu'on obtient par la voie sous-cutanée.

INFLUENCE DES DOSES D'ANTIGÈNE.

Expérience IV. — Dix lapins sont infectés par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins.

Quatre sont traités à partir du huitième jour après l'infection deux fois par semaine par injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'extrait méthylique de bacilles ayant subi un contact de quarante-huit heures avec l'acétone.

Les quatre autres reçoivent dans les mêmes conditions 3 cent. cubes du même antigène.

Deux lapins sont conservés comme témoins.

Les quatre premiers lapins, à part un, mort de pasteurellose le quatre-vingtième jour avec quelques rares tubercules pulmonaires, ont été sacrifiés en très bon état le cent cinquante-cinquième jour; ils présentaient des lésions tuberculeuses pulmonaires avec de rares lésions rénales.

Les lapins traités avec 3 cent. cubes d'antigène sont morts du soixantième au quatre-vingt-dixième jour avec des lésions tuberculeuses pulmonaires confluentes.

Les deux lapins témoins sont morts les soixante-dixième et quatre-vingtième jours de tuberculose généralisée.

Les doses excessives sont donc nettement défavorables.

Expérience V. — Quatre lapins sont infectés par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins et sont traités par injection sous-cutanée deux fois par semaine de 1/10 de cent. cube d'antigène méthylique, à partir du huitième jour après l'inoculation.

Le premier lapin meurt le cent sixième jour de pasteurellose avec quelques tubercules sur les poumons en foyers assez étendus.

Le deuxième lapin meurt le cent huitième jour de pasteurellose avec quelques petites granulations disséminées à la surface des poumons.

Le troisième lapin et le quatrième lapin sont en très bon état le cent soixantième jour.

Deux lapins témoins meurent les quatre-vingt-dix-huitième et cent septième jours avec des lésions généralisées aux poumons, à la rate et aux reins.

Les doses faibles d'antigène, répétées deux fois par semaine, paraissent donc plus efficaces que les doses élevées dans la tuberculose expérimentale du lapin. Nous poursuivons nos expériences pour déterminer comment agissent des quantités encore plus faibles et plus ou moins espacées.

EFFETS DES INJECTIONS D'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE
PRATIQUÉES A DES MOMENTS DIFFÉRENTS
DE L'INFECTION TUBERCULEUSE.

Les précédents essais nous ayant montré l'influence favorable des lipoïdes bacillaires sur l'évolution de la tuberculose des animaux de laboratoire, nous avons recherché si les effets de ces substances persistent longtemps après qu'elles ont été injectées. A cet effet, nous avons institué trois séries d'expériences. Dans la première, les animaux recevaient, quatre jours après l'inoculation virulente, trois injections intraveineuses de 5 cent. cubes d'antigène méthylique à deux jours d'intervalle. Dans la seconde, les lapins ont été traités par quatre injections intraveineuses de 4 cent. cubes d'antigène méthylique, aux mêmes intervalles, vingt-cinq jours avant l'inoculation virulente; ces injections étaient ensuite poursuivies par la même voie à des intervalles de trente jours, à la dose de 4/10 de cent. cube. Dans la troisième enfin, 5 cent. cubes d'antigène étaient injectés par la voie veineuse à quatre reprises, à deux jours d'intervalle, vingt-huit jours avant l'infection des animaux.

Des injections d'antigène ont été également pratiquées chez des cobayes par différentes voies avant l'inoculation virulente.

Expérience VI. — Cinq lapins sont infectés par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins.

Les quatrième, huitième et douzième jours après l'infection, ils reçoivent par la voie intraveineuse, 5 cent. cubes d'antigène méthylique.

Un lapin meurt le cent cinquième jour de tuberculose pulmonaire confluente; trois petits tubercules sur les reins.

Le deuxième lapin meurt le cent dix-neuvième jour de tuberculose pulmonaire confluente.

Le troisième lapin meurt le cent vingt-troisième jour avec de nombreux tubercules pulmonaires et un tubercule sur les reins.

Le quatrième lapin meurt le cent quarante-deuxième jour avec de grosses lésions pulmonaires.

Le cinquième lapin est sacrifié en bon état le cent cinquante-deuxième jour. Il ne présente que huit gros tubercules pulmonaires en chou-fleur. Pas d'autres lésions.

Trois lapins témoins sont morts les cinquante-deuxième, soixante et onzième et soixante-treizième jours avec des lésions tuberculeuses généralisées.

Expérience VII. — Six lapins reçoivent quatre injections intraveineuses de 4 cent. cubes d'antigène à deux jours d'intervalle; dix-huit jours après la dernière, ils sont infectés par inoculation intraveineuse de 0 milligr 001 de bacilles bovins. Les injections d'antigène ont été ensuite continuées, toujours par voie intraveineuse, à des intervalles de trente jours, à la dose de 1/10 de cent. cube.

Le premier lapin est mort de pasteurellose le cent dixième jour, en bon état, avec de gros tubercules pulmonaires isolés.

Les autres sont en parfait état le cent quarante-sixième jour.

Deux lapins témoins sont morts le quatre-vingt-treizième et le cent septième jour avec des lésions pulmonaires confluentes et des tubercules sur les reins.

Expérience VIII. — Six lapins reçoivent quatre injections intraveineuses de 3 cent. cubes d'antigène méthylique à deux jours d'intervalle. Vingt-huit jours après la dernière injection, ils sont éprouvés par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins.

Un lapin est sacrifié le cent dixième jour en très bon état. Il est atteint de tuberculose pulmonaire presque confluente; quelques tubercules sur les reins.

Un deuxième lapin est sacrifié le cent cinquante-neuvième jour en parfait état. Il présente quelques tubercules sur chaque poumon.

Un troisième lapin est sacrifié le deux cent huitième jour, très gras il a d'assez nombreux tubercules pulmonaires isolés, localisés surtout aux bases et deux petites granulations sur un rein. Les deux derniers lapins meurent le deux cent trente-quatrième jour avec de gros tubercules pulmonaires et quelques tubercules sur les reins.

Deux lapins témoins sont morts les cent unième et cent quinzième jours de tuberculose généralisée.

Expérience IX. — Six cobayes reçoivent par la voie sous-cutanée à trois jours d'intervalle quatre injections de 1 cent. cube d'antigène méthylique. Un mois après la dernière injection, ils sont éprouvés par instillation oculaire de 1 milligramme de bacilles bovins.

Un cobaye meurt le soixante-deuxième jour avec une adénite cervicale et deux petits tubercules sur la rate.

Un cobaye meurt le soixante-neuvième jour avec les mêmes lésions.

Un cobaye meurt le centième jour de tuberculose généralisée.

Un cobaye meurt le cent douzième jour avec de grosses lésions scléreuses de la rate et du foie.

Un cobaye meurt le cent trentième jour avec les mêmes lésions.

Un cobaye meurt le cent cinquante-septième jour de tuberculose généralisée.

Expérience X. — Cinq cobayes reçoivent par injection intracardiaque 1 cent. cube d'antigène méthylique, puis, à trois jours d'intervalle, par injection intrapéritonéale, 0 c. c. 5 d'antigène. Ils sont infectés un mois après la dernière injection par instillation oculaire de 1 milligramme de bacilles bovins.

Un cobaye meurt le soixante-quinzième jour avec une adénite cervicale et quelques tubercules sur la rate.

Un cobaye meurt le cent douzième jour avec une adénite cervicale et une granulation sur un poumon.

Un cobaye meurt le cent quarante quatrième jour avec une adénite cervicale et quelques fines et rares granulations sur les poumons.

Un cobaye meurt le cent cinquante-deuxième jour avec une adénite cervicale et des tubercules sur les poumons.

Un cobaye meurt le cent soixante-deuxième jour avec une adénite cervicale et des lésions pulmonaires sclérosées.

Quatre cobayes, témoins de ces deux expériences, meurent de tuberculose généralisée du quatre-vingt-dixième au cent cinquième jour.

Les injections d'antigène méthylique pratiquées à doses massives par la voie veineuse, quelques jours après l'inoculation virulente, produisent donc les mêmes effets que les injections renouvelées pendant le cours de la maladie.

Des résultats analogues sont obtenus par injection à doses massives d'antigène quinze à vingt jours avant l'inoculation.

TRAITEMENT PAR LES EXTRAITS CHLOROFORMIQUE, ÉTHÉRÉ ET TRICHLORÉTHYLÉNIQUE DE BACILLES DE KOCH PRÉALABLEMENT TRAITÉS PAR L'ACÉTONE.

Comme les extraits chloroformique et éthéré de bacilles de Koch présentent *in vitro* des propriétés antigéniques assez nettes, nous avons cherché si le chloroforme, l'éther et le trichloréthylène (1) dissolvent également des substances bacillaires actives *in vivo*.

A cet effet, 50 grammes de bacilles de Koch desséchés sont soumis pendant trois jours à l'action de l'acétone, puis répartis en trois lots qu'on émulsionne respectivement dans le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, à raison de 1 centigramme par centimètre cube de solvant.

(1) Jacobson a montré que l'alcool benzylique dissout rapidement les bacilles tuberculeux. Ces solutions bacillaires, au titre de 1 centigramme par centimètre cube, injectées à la dose de 1/10 à 2/10 de centimètre cube, ne nous ont pas paru modifier favorablement l'évolution de la tuberculose du lapin.

Expérience XI. — Trois lots de six lapins, infectés par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins, reçoivent sous la peau, deux fois par semaine, à partir du huitième jour après l'infection, 1 cent. cube d'un de ces extraits.

Tous les animaux traités par les extraits chloroformique et trichloréthylénique sont morts du soixantième au cent dixième jour avec les mêmes lésions et dans les mêmes délais que les témoins.

Au contraire, sauf deux d'entre eux morts d'infections intercurrentes au début de l'expérience, les lapins traités par l'extrait éthéré se sont maintenus en bon état jusqu'au cent trentième jour après l'inoculation virulente. Sacrifiés à ce moment, ils présentaient de rares lésions pulmonaires au début. Les autres organes étaient indemnes.

Expérience XII. — Quatre lapins sont infectés par injection intraveineuse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins. Ils sont traités deux fois par semaine par des injections sous-cutanées de 1 cent. cube d'extrait éthéré, le traitement étant commencé huit jours après l'inoculation virulente.

Le 1^{er} lapin meurt le cent-cinquante-deuxième jour avec des lésions pulmonaires nombreuses mais non confluentes, un tubercule sur un rein.

Le 2^e lapin meurt le cent soixante-dixième jour avec des lésions pulmonaires confluentes et de rares granulations sur les reins.

Les deux autres lapins survivent à cette date.

Deux lapins témoins sont morts le cent deuxième et le cent seizième jour de tuberculose généralisée aux poumons, à la rate et aux reins.

Les animaux tuberculeux traités par l'extrait éthéré de bacilles de Koch se comportent donc comme les animaux traités par les extraits méthyliques des mêmes bacilles. Toutefois, ces extraits provoquent la formation de nodules au point d'inoculation. Nous nous proposons de voir si une extraction plus complète des graisses fait disparaître cet inconvénient.

TRAITEMENT PAR LES EXTRAITS MÉTHYLIQUES DE BACILLES PARATUBERCULEUX ET DE BACILLES DIPIHTÉRIQUES PRÉALABLEMENT TRAITÉS PAR L'ACÉTONE.

Les extraits méthyliques de bacilles paratuberculeux et de bacilles diphtériques, mis en contact avec un sérum antituberculeux, fixent l'alexine à un taux presque aussi élevé que les extraits méthyliques de bacilles tuberculeux. *In vivo*, ils

provoquent également la formation d'anticorps qui fixent l'alexine à la fois avec les extraits correspondants et l'antigène tuberculeux.

Afin de préciser les relations qui unissent ces différents antigènes et leur action dans la tuberculose expérimentale, nous avons traité deux lots de cinq lapins au moyen d'injections sous-cutanées bi-hebdomadaires de 1 cent. cube de chacun d'eux. Les résultats ont été complètement négatifs.

* * *

Sauf une légère élévation de température, les lipoïdes du bacille de Koch, injectés même à fortes doses (2 à 5 cent. cubes), et par la voie veineuse, ne provoquent aucun trouble immédiat ou tardif chez les lapins et les cobayes tuberculeux. Ces injections peuvent être renouvelées deux ou trois fois par semaine, par la voie sous-cutanée, sans aucun risque pour les animaux.

Qu'ils soient injectés à doses massives (5 cent. cubes) à trois ou quatre reprises, par la voie veineuse, peu avant ou immédiatement après l'inoculation virulente, ou à doses faibles et répétées pendant toute la durée de l'infection, ces lipoïdes bacillaires agissent d'une manière sensiblement identique dans la tuberculose expérimentale : conservation d'un bon état général jusqu'à la période ultime de la maladie, survie prolongée dépassant parfois de cinq à six mois le délai de l'infection normale.

Si la cachexie tuberculeuse était, comme nombre d'auteurs l'admettent, la conséquence de la résorption de poisons bacillaires ou de substances toxiques élaborées dans les foyers, on pourrait supposer que l'antigène méthylique a pour effet de ralentir la production de ces substances ou de les neutraliser. Les extraits méthyliques déterminent bien chez les animaux normaux, et accroissent chez les animaux tuberculeux, la formation d'anticorps décelables par la déviation du complément. Mais il ne semble pas, d'après nos expériences actuelles, qu'on puisse attribuer à ces seuls anticorps fixateurs une action neutralisante sur les poisons bacillaires. Il convient de faire toutes réserves sur cette interprétation des phénomènes observés et de poursuivre les recherches.

La survie des animaux tuberculeux traités par l'antigène résulte à la fois d'une extension plus lente des foyers et d'une dissémination bacillaire plus discrète ; ce qui se traduit à l'autopsie par des lésions beaucoup moins massives et confluentes que chez les témoins et souvent limitées à un seul organe : poumons chez les lapins, rate chez les cobayes. Parfois même, on n'observe que de rares mais volumineux nodules faisant saillie à la surface du tissu. Enfin, chez quelques sujets dont la survie a été particulièrement longue (près de huit mois), nous avons noté la sclérose cicatricielle des foyers pulmonaires et rénaux.

Ce qui marque avec le plus de netteté cette action de l'antigène méthylique, c'est l'action inverse qu'exercent les extraits acétoniques bacillaires sur la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye. Il suffit même que l'extraction préalable des graisses et des cires des corps microbiens par l'acétone soit insuffisante dans la préparation de l'antigène, pour que ses effets thérapeutiques apparaissent nuls. D'autre part, si l'alcool méthylique extrait des bacilles de Koch une petite quantité de tuberculine, celle-ci, comme le montre notre expérience I, injectée à la dose de 0 c. c. 01 au lapin et au cobaye tuberculeux, ne manifeste aucune propriété thérapeutique. Par conséquent, nous pouvons attribuer aux seuls lipoïdes bacillaires solubles dans l'alcool méthylique et insolubles dans l'acétone, c'est-à-dire aux phosphatides, les effets favorables de l'antigène.

Des essais de traitement au moyen de l'antigène méthylique ont été effectués depuis deux ans chez des malades atteints de tuberculose pulmonaire ou de lupus. Des résultats intéressants ont été obtenus, dont certains sont exposés dans les travaux signalés ci-après. Dans l'ensemble, ils confirment nos propres constatations : innocuité de l'antigène, amélioration de l'état général, cicatrisation des lésions lupiques, tendance à la sclérose des lésions pulmonaires.

BIBLIOGRAPHIE

P. ARMAND-DELILLE, G. DUHAMEL et P. MARTY, Processus fibreux du poumon chez un jeune sujet tuberculeux ayant reçu des injections d'antigène méthylique. *C. R. Société de Biologie*, 89, p. 4216.

P. ARMAND-DELILLE, G. DUHAMEL et P. MARTY, Etude de l'influence des injections d'antigène méthylique pratiquées chez des enfants tuberculeux. *C. R. Société de Biologie*, 90, p. 936, et *Revue de la tuberculose*, 5, n° 4, août 1924.

A. BOQUET et L. NÈGRE, Mode de préparation et pouvoir antigène des extraits alcooliques de bacille tuberculeux. *C. R. Société de Biologie*, 82, 19 juin 1920 ; Valeur antigène comparative des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et de microbes divers. *C. R. Société de Biologie*, 83, 26 juin 1920 ; Sur le pouvoir antigène des extraits méthyliques de bacilles tuberculeux. *C. R. Société de Biologie*, 84, 15 janvier 1924 ; Recherches sur la valeur antigène des émulsions bacillaires et des extraits éthyliques et méthyliques de bacilles tuberculeux ; ces *Annales*, 35, mai 1921 ; Sur la recherche des anticorps tuberculeux par les extraits méthyliques de bacilles de Koch. *Revue de la tuberculose*, 2, n° 5, 1921 ; Sur la propriété antigène *in vivo* des extraits méthyliques de bacilles tuberculeux. *C. R. Société de Biologie*, 86, 18 mars 1922 ; Pouvoir antigène *in vivo* et *in vitro* des bacilles de Koch et de leurs extraits. *C. R. Société de Biologie*, 86, 25 mars 1922 ; Sur les propriétés antigènes des extraits alcoolo-méthyliques de bacilles de Koch et des lécithines. *C. R. Société de Biologie*, 86, 1er avril 1922 ; Effets des injections de l'extrait méthylique de bacilles de Koch sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin. *C. R. Société de Biologie*, 87, 2 décembre 1922, p. 1162 ; Sur l'action locale et générale de l'antigène tuberculeux méthylique chez les tuberculeux. *C. R. Société de Biologie*, 88, 28 avril 1923, p. 1.068 ; Sur le rôle des lipoïdes du bacille de Koch. *Congrès national de la tuberculose de Strasbourg*, juin 1923 ; Sur les propriétés biologiques des lipoïdes du bacille de Koch. *C. R. Société de Biologie*, 89, 16 juin 1923, p. 138 ; Sur les propriétés biologiques des lipoïdes du bacille tuberculeux. Ces *Annales*, 37, septembre 1923, p. 787 ; Action des divers constituants du bacille de Koch sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye. *C. R. Académie des Sciences*, 3 mars 1924 ; Action de l'antigène méthylique sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye. *Revue de la tuberculose*, juin 1924, n° 3, 5, p. 388.

HALBRON et ISAAC GEORGES, Essai de traitement de quelques cas de lupus tuberculeux par l'antigène méthylique de Boquet et Nègre. *Revue de la tuberculose*, 5, n° 3, juin 1924.

LORTAT, JACOB et BETHOUX, Deux cas de lupus traités avec succès par l'antigène méthylique de Boquet et Nègre. *C. R. Société de Dermatologie*, mars 1924 ; Traitement du lupus par l'antigène méthylique de Boquet et Nègre. *Revue de la tuberculose*, 5, n° 5, octobre 1924.

(*Laboratoire de M. le Professeur Calmette,
à l'Institut Pasteur.*)

SUR LES FACTEURS DES VARIATIONS DE ρH DANS LES CULTURES DE BACILLE DIPHTÉRIQUE

par G. ABT et G. LOISEAU.

(*Travail du Laboratoire du D^r L. Martin.*)

En étudiant l'influence de la réaction du milieu sur la production de la toxine diphtérique (1), nous avions constaté que dans les cultures dont le ρH initial est supérieur à 7,2, il y avait les premiers jours un léger déplacement de la réaction vers l'acidité, tandis que dans celles dont le ρH initial était inférieur à 7,0, cette phase d'acidification manquait et l'alcalinisation était déjà manifeste au bout de vingt-quatre heures. D'après des expériences préliminaires, nous avions avancé l'hypothèse que l'acide carbonique joue un rôle important dans les variations de la réaction. D'autre part, nous avions montré que la production d'ammoniaque ne suffit pas pour amener le milieu aux réactions alcalines que l'on observe après une dizaine de jours de culture; et nous supposions que la formation de carbonates ou bicarbonates, aux dépens des acides organiques présents dans le bouillon Martin, contribuait à l'alcalinisation.

Depuis la publication de notre travail, Sierakowski (2), puis Sierakowski et Zajdel (3) ont observé que les cultures de diverses bactéries (colibacille, vibron cholérique, typhiques et paratyphiques, dysentériques) tendaient à amener dans les premiers jours le ρH à un niveau voisin de 7,0, puis s'alcalinisaient franchement. Ils attribuent à l'acide carbonique un rôle prépondérant dans ces changements de réaction; cet acide s'accumulerait par exemple dans le milieu lorsque l'on cultive en vase clos et se dégagerait des cultures à l'air libre: le ρH se fixe vers 6,8 dans le premier cas et dépasse 8,0 dans le second.

(1) Ces *Annales*, 35, 1922, p. 533.

(2) SIERAKOWSKI. *C. R. Société de Biologie*, 89, 1923, p. 1371.

(3) SIERAKOWSKI et ZAJDEL. *C. R. Société de Biologie*, 90, 1924, p. 1108.

La Commission anglaise, qui a publié sous les auspices du *Medical Research Council* un ouvrage important sur la diphtérie (1), a vérifié de son côté le fait que les quantités d'ammoniaque produites par le bacille diphtérique ne suffisent pas pour amener la réaction aux degrés d'alcalinité observés; elle a adopté l'hypothèse d'une intervention de carbonates provenant des acides organiques et constaté que le bacille diphtérique fait disparaître rapidement du milieu le succinate ou le malate de soude que l'on y introduit.

Nous nous sommes proposé, en continuant nos recherches, d'élucider les questions suivantes :

I. — Quelles sont les quantités de CO_2 , CO_2NaH , CO_2Na_2 , que l'on peut trouver dans les cultures de bacille diphtérique, à différents stades du développement et avec des *pH* initiaux différents? Quelle est l'influence de ces quantités sur la réaction?

II. — Y a-t-il des acides organiques à l'origine dans le bouillon Martin, et que deviennent-ils pendant la culture? Le bacille en produit-il, notamment pendant la phase d'acidification?

III. — Dans quelle mesure l'alcalinisation du milieu relève-t-elle de la production d'ammoniaque? Quels sont les autres facteurs qui peuvent y participer?

Les données que ces analyses nous ont fournies apportent, croyons-nous, une explication satisfaisante de la marche de la réaction, que le milieu soit à l'origine acide ou alcalin.

I. — Acide carbonique, bicarbonates et carbonates.

TECHNIQUE. — Nous avons dosé CO_2 dans les cultures par la méthode de Frésénius-Classen. Le gaz carbonique est entraîné, à l'ébullition, par un faible courant d'air privé de CO_2 , à travers une série de tubes desséchants d'abord, puis de trois tubes en U contenant respectivement de la chaux sodée et des proportions de $3/4$ et $2/3$ de chaux sodée pour $1/4$ et $1/3$ de CaCl_2 . Le poids de CO_2 est donné par la pesée de ces trois tubes. Mais lorsqu'on fait bouillir dans l'appareil un milieu de culture, des acides organiques volatils sont entraînés avec CO_2 et faussent le résultat des pesées. Il est donc nécessaire de faire d'abord passer le courant d'air entraînant CO_2

(1) *Diphtheria. Publications du Medical Research Council*, Londres, 1923, p. 95 à 97.

dans une suite d'au moins deux récipients clos contenant de l'eau de baryte : les sels de baryum des acides organiques sont solubles aux concentrations que l'on peut rencontrer, tandis que le carbonate de baryum se précipite. On le recueille par filtration très rapide sur un filtre soutenu par un cône de platine perforé, en s'aidant d'une légère succion à la trompe. Puis on introduit le précipité et le filtre dans l'appareil de Frésénius-Classen, avec de l'eau distillée additionnée d'une quantité convenable d'acide sulfurique. L'acide carbonique qui se dégage alors est recueilli dans les tubes à chaux sodée. Il est impossible d'éviter que la surface de la solution de baryte ne se carbonate à l'air, pendant qu'on verse sur le filtre pour recueillir le précipité. Après de nombreuses déterminations, nous estimons à 3 milligrammes environ l'excès de CO_2 que cette cause d'erreur fait apparaître dans les dosages; nous avons retranché systématiquement ce chiffre de toutes nos pesées. Pour chaque essai, nous prélevons aseptiquement une quantité suffisante du milieu, filtrons à la bougie avec le minimum de succion (opération qui ne fait pas varier sensiblement la concentration de CO_2 dissous), et traitons 40 cent. cubes dans l'appareil de Frésénius-Classen.

L'ébullition du liquide dans un courant d'air provoque le dégagement du CO_2 libre, et aussi, théoriquement, de la moitié du CO_2 contenu dans le bicarbonate de soude, deux molécules de CO_3NaH donnant naissance à une molécule de CO_2 et une de CO_3Na^+ . En reprenant le liquide après l'opération, et recommençant le chauffage, mais en présence d'un peu d'acide sulfurique, on recueille une nouvelle quantité de CO_2 , dégagé du CO_3Na^+ . Si cette quantité est inférieure à celle qui a été obtenue sans addition d'acide sulfurique, le liquide contenait le double de CO_2 à l'état de bicarbonate de soude, plus un excès de CO_2 libre. C'est le cas à peu près constant. Si, au contraire, la seconde opération donnait plus de CO_2 que la première, il y aurait du carbonate de soude à côté de bicarbonate.

Il suit toutefois des expériences témoins que, avec un courant d'air et une ébullition suffisamment modérés pour ne pas s'exposer à des pertes de CO_2 , la décomposition du bicarbonate n'est pas totale en une heure, et davantage; elle peut même n'atteindre que 80 p. 100 du bicarbonate. Le total de CO_2 recueilli est donc toujours exact; mais en comptant comme bicarbonate le double de la quantité donnée par la seconde opération, on en force un peu les chiffres, au détriment du CO_2 libre. Cette erreur n'est pas assez forte pour avoir une influence sur l'interprétation des résultats.

Il est possible d'autre part que, surtout vers la fin de la durée de la culture, une partie du CO_2 soit à l'état de carbonate d'ammonium. Ce composé est détruit par l'ébullition; l'ammoniac se trouve retenu dans les tubes des séchants à SO_4H_2 et l'acide carbonique est compté comme de l'acide libre.

A côté du CO_2 contenu dans le liquide, nous avons dosé celui qui se dégage pendant la période de culture. Les ballons Fernbach, contenant un volume de liquide qui est, après la stérilisation, d'environ 1.100 cent. cubes, sont munis, au-dessus du coton, d'un bouchon de caoutchouc traversé par trois tubes. L'un de ces tubes, courbé au dehors en siphon à longue éffilure, plonge dans le milieu et est destiné aux prélèvements. Les deux autres, munis de filtres de coton cardé, servent à l'arrivée et au départ du courant d'air; le premier se termine juste au-dessous du coton, le second affleure à 1 centimètre au-dessus du niveau du liquide. Le courant d'air est produit par un aspirateur à eau, et réglé à raison de 10 litres environ en deux heures, tous les jours, ou moins souvent à la fin de la période de culture. Avant d'arriver au ballon, il traverse un flacon garni de potasse à 30 p. 100, puis

deux gros tubes en U à ponce sulfurique et à chaux sodée granulée. A la sortie du ballon, il passe à travers deux éprouvettes à CaCl_2 , un tube à CaCl_2 qui sert de témoin pour l'entraînement de la vapeur d'eau, un tube à chaux sodée, un à chaux sodée plus 1/4 de CaCl_2 , un à chaux sodée plus 1/3 de CaCl_2 ; enfin, pour éviter les retours de vapeur d'eau et de CO_2 , on termine par deux gros tubes à ponce sulfurique et à chaux sodée. Le tout est disposé dans la chambre-étuve. La pesée des trois tubes à chaux sodée et chaux sodée plus CaCl_2 donne le poids de CO_2 entraîné. Nous nous sommes assurés, en faisant barboter le courant d'air dans des tubes à boules de Liebig garnis d'eau distillée, qu'il n'y a pas de dégagement d'acides volatils, susceptibles de fausser les pesées.

TABLEAU I. — CO_2 en milligrammes par litre.

AGE de la culture	I		IV		VIII		II		VI	
	pH	CO_2								
Origine . . .	6,40	0	6,60	55	6,75	37	8,0	0	8,2	276
2 jours. . .	—	—	6,65	250	7,05	267	7,55	370	7,50	492
4 jours. . .	6,70	132	6,80	345	7,40	606	7,70	623	7,50	667
6 jours. . .	7,05	272	7,35	645	7,95	632	7,83	816	—	—
7 jours. . .	—	—	—	—	—	—	—	—	7,60	1.107
8 jours. . .	—	—	7,35	890			7,90	742	—	—
10 jours. . .	7,15	483	—	—			—	—	—	—
11 jours. . .	—	—	8,40	1.137			—	—	7,85	1.130
12 jours. . .	—	—	—	—			8,30	890	—	—
14 jours. . .	7,50	1.097					—	—	8,25	1.295
16 jours. . .	—	—					8,40	985	—	—
19 jours. . .	—	—					—	—	8,4	950
21 jours. . .	—	—					8,50	1.080	—	—
30 jours. . .	—	—					—	—	8,45	1.220
32 jours. . .	—	—					8,60	920	—	—
33 jours. . .	7,75	807					—	—		

Acide carbonique. — Le tableau I donne, en milligrammes par litre et aux dates indiquées, les quantités de CO_2 libre trouvées dans cinq bouillons différents, ainsi que les pH aux mêmes dates.

Ces chiffres montrent surtout que des quantités importantes de CO_2 s'accumulent dans le milieu de culture; dans les bouillons VIII, II, VI, plus alcalins à l'origine, elles dépassent 600 milligrammes par litre dès le quatrième jour; dans tous (sauf VIII, qui a été interrompu trop tôt), elles arrivent au delà de 1 gramme par litre, respectivement le quatorzième jour (I), le onzième jour (IV), le vingt et unième jour (II) et le septième jour (VI). Du reste, elles présentent de larges oscillations dans le même bouillon; il ne saurait être question de tracer une courbe de l'accumulation de CO_2 dans les cultures. Le phénomène est en partie fonction du dégagement de CO_2 , qui est lui-même sous la dépendance de facteurs multiples.

Mais la présence de CO_2 dans le milieu peut en abaisser notablement le pH . Nous avons essayé de la réaliser, avec des quantités approximativement connues, introduites dans le bouillon Martin ajusté au préalable à un pH déterminé. Pour préparer une dissolution de CO_2 approximativement titrée, nous mélangeons 20 cent. cubes de solution $n/2$ de CO_2Na_2 et 20 cent. cubes de solution $n/2$ de HCl . On contrôle la réaction du mélange au méthylorange, amène avec 1 ou 2 gouttes de HCl au virage rose, revient au jaune avec quelques gouttes de CO_2NaH $n/5$, et ajoute enfin 0 c.c. 5 de CO_2NaH $n/5$. Nous verrons plus loin que l'addition de cette petite quantité de CO_2NaH n'a pas d'influence appréciable sur le pH du bouillon Martin; elle sert de garantie contre la présence éventuelle d'une trace de HCl libre. On prélève dans le mélange ainsi préparé le volume de liquide qui contient la quantité de CO_2 à introduire dans le bouillon Martin, pour obtenir une concentration donnée. A 25 cent. cubes de bouillon, dont le pH est 7,85, on ajoute respectivement des quantités de CO_2 correspondant à 300, 600, 1.200 milligrammes par litre; on obtient les pH , 7,30, 6,90 et 6,65. Il peut donc y avoir assez de CO_2 dans le milieu de culture pour abaisser le pH de 1,0 à 1,2. Cette influence s'exercerait particulièrement dans les bouillons à réaction initiale très alcaline.

Mais ce n'est là qu'une constatation de principe. En fait le CO_2 contenu dans les milieux n'a pas sur le pH une influence d'une amplitude aussi considérable. Il est bien loin surtout de pouvoir rendre compte des variations de la réaction. En effet :

1^o Il n'y a pas de rapport défini entre une quantité donnée de CO_2 et un pH déterminé. Nous trouvons 1.097 milligrammes par litre avec $pH = 7,50$; 1.130 milligrammes avec $pH = 7,85$; 1.137 milligrammes avec $pH = 8,4$; 1.080 milligrammes avec $pH = 8,5$.

2^o Les grandes oscillations dans les quantités de CO_2 dissoutes n'entraînent pas de grands écarts de pH . Nous voyons la réaction passer de 7,50 à 7,60 et CO_2 de 667 à 1.107 milligrammes (VI); ou le pH rester stationnaire à 7,35 et CO_2 passer de 645 à 890 (IV). Inversement le pH passe de 7,4 à 7,95 et CO_2 de 608 à 632 (VIII); ou de 7,85 à 8,25 et CO_2 de 1.130 à 1.295 seulement (VI). Dans ce même bouillon VI, la quantité de CO_2 varie peu du septième au trentième jour (1.107 à 1.220), pendant que le pH passe de 7,60 à 8,45.

3^o Des quantités de CO_2 de même ordre sont atteintes avec des bouillons dont le pH initial est très différent. Dans le bouillon I, qui est ajusté à 6,1, on arrive à 1.097 milligrammes au quatorzième jour; dans le bouillon IV, qui est à 6,6 à 1.137 milligrammes au onzième jour; dans le bouillon II, qui est à 8,0, à 1.080 milligrammes au vingt et unième jour; dans le bouillon VI, qui est à 8,25, à 1.107 milligrammes au septième jour. Il est impossible de tirer de ces chiffres aucune règle.

Peut-on dire au moins que CO_2 est en général retenu dans les milieux alcalins et dégagé des milieux acides? Il est certain que les milieux dont le pH est inférieur à 7,0 sont à l'origine tous pauvres en CO_2 (mais il en est de même du bouillon II, dont le pH initial est 8,0). De plus, les chiffres au-dessous de $pH = 7,0$ ne dépassent guère 250 milligrammes, tandis qu'ils sont plus élevés dans les cultures alcalines de même âge. Il n'est pas exact néanmoins que tout l'acide carbonique se dégage quand la réaction du milieu est acide, ni qu'il reste dans le milieu quand elle est alcaline.

La mesure directe du CO_2 dégagé a été effectuée sur les mêmes cultures et a donné les chiffres groupés dans le tableau II. (La

première colonne indique pour chaque culture le poids de CO_2 dégagé depuis la pesée précédente; la deuxième le poids total recueilli depuis le début.)

Nous avons été surpris de constater que les quantités de CO_2 dégagées sont encore notablement supérieures à celles qui s'accumulent dans le milieu. Nous n'insisterons pas pour le moment sur la production de CO_2 par le bacille diphtérique dans le bouillon Martin, réservant pour un autre mémoire l'étude de cette question.

Le dégagement de CO_2 est considérable, quelle que soit la réaction initiale du milieu, et à peu près de même ordre, plus de 2 grammes par ballon, avec les bouillons ajustés au voisinage de 6,0 ou au-dessus de 8,0. Remarquons qu'il n'y a pas lieu de s'étonner des fluctuations que l'on observe dans le dégagement de CO_2 au cours de la culture; elles dépendent en partie des influences qui peuvent agir dans le milieu sur ce dégagement; mais d'autre part, il est impossible de régler tous les jours le courant d'air à la même vitesse, et par suite de faire passer dans le même temps le même volume de gaz; d'où des irrégularités de détail. Retenons seulement l'allure générale du phénomène: les quantités dégagées par jour, maxima au début, sont en moyenne inférieures à 200 milligrammes après le sixième ou dixième jour, et inférieures à 100 milligrammes après le quinzième jour.

Elles sont proportionnelles à l'activité biologique de la culture.

Il semble, à lire les chiffres, que le dégagement de CO_2 soit, contrairement à ce que l'on pouvait supposer, plus important dans les premiers jours des cultures alcalines que des cultures acides; le bouillon I ($\text{pH}=6,4$) fournit 753 milligrammes en cinq jours, le bouillon IV ($\text{pH}=6,6$) en fournit 666, le bouillon II ($\text{pH}=8,0$) 1.192 et le bouillon VI ($\text{pH}=8,25$) 836. Mais nous montrerons, quand nous étudierons la production de CO_2 par le bacille diphtérique, que l'activité de la culture est plus grande les premiers jours dans les milieux alcalins que dans les milieux acides. La production moyenne totale par jour (CO_2 retenu dans le liquide et CO_2 dégagé) est au quatrième jour de 181 et 171 milligrammes pour les bouillons I et IV, de 380 et 385 milligrammes pour les bouillons II et VI. Il n'est

TABLEAU II. — CO_2 dégagé des cultures,
en milligrammes par 1.100 cent. cubes de milieu environ.

pas étonnant que la fraction dégagée soit plus considérable pour les seconds.

Au delà du vingtième jour, avant pour certaines cultures, le dégagement de CO_2 devient faible, bien que les quantités dissoutes dans le milieu soient importantes. Par exemple dans le bouillon II, à partir du seizième jour ($\text{pH}=8,4$), la moyenne de 6 pesées n'est que de 49 milligrammes et le total dégagé de 295 milligrammes, bien que le liquide contienne à chaque prélevement plus de 1 gramme de CO_2 . Il est probable qu'une partie de ce CO_2 fait équilibre à de l'ammoniaque; il ne se dégage pas spontanément; mais, dans nos dosages de l'acide carbonique contenu dans le milieu, il est entraîné par le courant d'air à l'ébullition et figure dans le chiffre de CO_2 libre. Les quantités de NH_3 qui existent dans le bouillon II au seizième et au trente-deuxième jour sont respectivement de 300 et 350 milligrammes environ; elles seraient saturées par 780 et 910 milligrammes de CO_2 . Ces chiffres ne sont pas loin de couvrir les quantités de CO_2 présentes dans le milieu. Nous verrons toutefois que l'ammoniaque doit aussi neutraliser soit des acides organiques, soit des monophosphates. Une partie de CO_2 est-elle retenue dans le milieu par une autre combinaison? Se forme-t-il des acides carbaminés par fixation de CO_2 sur des acides aminés? Il ne nous a pas paru possible de caractériser de telles combinaisons, aux concentrations où elles pourraient exister dans les cultures.

En résumé, les quantités notables de CO_2 qui sont dissoutes dans le milieu de culture peuvent éventuellement provoquer un déplacement de la réaction vers l'acidité. Mais l'influence de ce facteur est trop largement compensée par celle de plusieurs autres pour qu'elle puisse, envisagée isolément, rendre compte des pH observés. Elle dépend essentiellement de la proportion de CO_2H_2 ionisée. Celle-ci est elle-même conditionnée, non seulement par la concentration en CO_2 , mais par celle des carbonates ou bicarbonates. De plus, l'acide carbonique est neutralisé par l'ammoniaque, dans une proportion que nous ne pouvons pas apprécier. Enfin, nous verrons plus loin qu'il semble exister un certain équilibre entre CO_2 libre, le bicarbonate de soude et les phosphates primaires et secondaires.

Bicarbonates. — Les quantités de CO_2 qui existent dans le

milieu de culture sous la forme de bicarbonates (avec la légère majoration des chiffres que nous avons signalée en décrivant notre technique) sont indiquées dans le tableau III, pour les mêmes bouillons que ceux du tableau I.

TABLEAU III. — CO₂ des bicarbonates, en milligrammes par litre.

AGE de la culture	I		IV		VIII		II		VI	
	pH	CO ₂								
Origine. . .	6,40	0	6,60	0	6,75	0	8,0	49	8,25	0
2 jours. . .	—	—	6,65	0	7,05	0	7,55	445	7,50	265
4 jours. . .	6,70	0	6,80	0	7,40	80	7,70	310	7,50	575
6 jours. . .	7,05	80	7,35	0	7,95	280	7,85	255	—	—
7 jours. . .	—	—	—	—	—	—	—	—	7,60	705
8 jours. . .	—	—	7,35	430			7,90	300	—	—
10 jours. . .	7,45	424	—	—			—	—	7,85	710
11 jours. . .	—	—	8,10	370			—	—	—	—
12 jours. . .	—	—		—			8,30	265	—	—
14 jours. . .	7,50	50					—	—	8,25	455
16 jours. . .	—	—					8,40	365	—	—
19 jours. . .	—	—					—	—	8,40	745
21 jours. . .	—	—					8,50	760	—	—
30 jours. . .	—	—					—	—	8,45	737
32 jours. . .	—	—					8,60	700	—	—
33 jours. . .	7,75	245					—	—		

Les quantités de bicarbonates augmentent dans l'ensemble avec l'âge de la culture. Mais elles sont sujettes à des oscillations. Nous verrons plus loin que le bacille diphtérique produit

des acides organiques; ils réagissent immédiatement sur les bicarbonates, qui jouent le rôle de tampons, et diminuent jusqu'à ce qu'il s'en forme à nouveau.

Le bicarbonate de soude n'apparaît jamais au-dessous de $pH = 7,0$. Nous montrerons qu'il peut s'en former, par le même mécanisme qu'au-dessus de 7,0. Mais il est instable à la concentration en ions H qui existe à ce moment dans le milieu. Aussi les quantités de bicarbonates dosées dans les bouillons dont le pH initial est voisin de 6,0 sont-elles faibles : dans notre bouillon I ($pH = 6,1$) le maximum atteint est 215 milligrammes, tandis que le chiffre s'élève à 760 milligrammes dans le bouillon II ($pH = 8,0$) et 745 dans le bouillon VI ($pH = 8,25$). Il y a toutefois à l'infériorité des bouillons acides une autre raison, qui s'ajoute à celle-ci. Ces bouillons sont pauvres en Na disponible, parce que HCl que l'on a introduit pour abaisser la réaction, à $pH = 6,0$ par exemple, a fixé du Na, dans une combinaison qui ne peut plus le restituer (NaCl).

Pour nous rendre compte de l'accroissement de la concentration en bicarbonate au-dessus de $pH = 7,0$, calculons les moyennes de 5 bouillons, de manière à effacer les irrégularités provenant des oscillations. Nous obtenons les chiffres suivants :

pH	MILLIGRAMMES
7,1.	66
7,2.	96
7,3.	92
7,4.	164
7,5.	294
7,6.	408
7,7.	410
7,8.	487
8,2.	360
8,4.	750

Les quantités restent faibles jusqu'à 7,4; elles croissent brusquement vers 7,4 à 7,5 et surtout de 7,5 à 7,6. Vient ensuite un palier, et même une diminution quelquefois, jusque vers 8,2, puis une forte augmentation au delà. Cette marche nous paraît conditionnée par la composition des mélanges de phosphates primaires et secondaires.

Ayers et Rupp (1), étudiant l'acidification suivie d'alcalinisation dans les cultures du groupe *coli-aerogenes*, en milieu sucré et phosphaté, interprètent le renversement de la réaction de la manière suivante : les acides de fermentation du sucre déplacent Na du phosphate disodique; puis le sel de sodium de l'acide organique est transformé en bicarbonate de sodium, sur lequel réagit à son tour le phosphate acide pour donner du CO_2 et du phosphate disodique.

Voyons quel peut être le rôle des phosphates dans les cultures de bacille diphthérique. Nous avons dosé l'acide phosphorique, par séparation à l'état de phosphomolybdate d'ammonium et pesée du pyrophosphate de magnésium. Les quantités trouvées correspondaient à des poids de 1 gr. 848 de phosphate disodique par litre dans un bouillon, 1 gr. 794 par litre dans un autre. Ajoutons que le phosphore contenu dans les corps microbiens, à la fin de la culture, était égal à 4,83 p. 100 du phosphore du milieu à l'origine (pour le premier de ces deux bouillons). Une solution n/75 de phosphate disodique contenant 1 gr. 8933 de ce sel par litre, nous avons considéré pour nos expériences le bouillon Martin comme formant une solution n 75 d'un mélange de phosphates primaires et secondaires.

L'intervention de ces phosphates explique un premier fait, peut-être inattendu : l'addition de bicarbonate de soude, dans les limites des concentrations qui existent dans les cultures, n'a qu'une influence insignifiante sur la réaction. Dans un bouillon de $pH = 7,50$, on introduit une quantité de $CO_2 NaH$ correspondant à 714 milligrammes de CO_2 par litre; le pH passe à 7,55; ou dans un bouillon de $pH = 8,10$, une quantité de $CO_2 NaH$ correspondant à 452 milligrammes par litre; le pH passe à 8,15. (Celui de la solution de bicarbonate n/10 employée était 8,8.) Ce n'est donc pas la présence dans le milieu du bicarbonate comme tel, qui peut amener au pH observé à la fin de la culture.

Mais prenons une solution n/75 de phosphate monopotassique, portée par addition de soude à $pH = 7,0$. Pour passer à $pH = 8,0$, il faut ajouter à 5 cent. cubes de ce phosphate soit 2 c.c. 4 de $NaOH$ n/100, soit 2 c.c. 4 de $CO_2 NaH$ n/10; c'est-à-

1) AYERS et RUPP. *Journ. of Infectious Diseases*, 33, 1918, p. 188.

dire dans le second cas, dix fois plus de Na. En d'autres termes, il semble que 10 p. 100 du CO_3NaH ajouté réagissent seuls avec le phosphate primaire qui restait dans la solution. En opérant de la même manière sur des volumes de 5 cent. cubes de phosphates dont le $p\text{H}$ est 7,0, on calcule que le CO_3NaH qu'il faut ajouter pour arriver à $p\text{H}$ 7,4 réagit dans la proportion de 11,7 p. 100 et pour arriver à $p\text{H}$ 8,6 dans la proportion de 7,3 p. 100. Il s'établit entre les phosphates et le bicarbonate un équilibre, tel que la fraction du bicarbonate qui est décomposée est d'autant plus faible que le $p\text{H}$ atteint est plus éloigné du côté de l'alcalinité.

Appliquons ces remarques à nos milieux de culture; le bicarbonate de soude produit transformera un phosphate primaire en phosphate secondaire, mais il pourra exister dans le milieu des quantités de bicarbonate environ dix fois plus fortes que celles qui contiennent le sodium nécessaire pour réaliser la transformation accomplie. On peut calculer le phosphate primaire présent d'après le $p\text{H}$ du milieu. Dans l'échelle colorimétrique de Clark et Lubs (1), à la concentration $n/20$, la proportion pour 100 de phosphate primaire dans le mélange de phosphates est pour les différents $p\text{H}$:

$p\text{H}$	POURCENTAGE de PO_4KH_2
5,8	92,56
6,0	88,60
6,2	82,80
6,4	74,80
6,6	64,40
6,8	52,70
7,0	40,74
7,2	30,00
7,4	21,00
7,6	14,40
7,8	9,60
8,0	6,40

On voit qu'au delà de 7,4, les quantités de monophosphate deviennent rapidement très faibles. On amènerait le $p\text{H}$ par échelons de 7,0 à 8,0 en ajoutant, pour 100 cent. cubes de volume total, les quantités ci-dessous de soude de même concentration moléculaire :

(1) CLARK et LUBS, *Journ. of Bacteriology*, 2, p. 25.

CENTIMÈTRES CUBES

De 7,0 à 7,2	10,74
De 7,2 à 7,4	9,0
De 7,4 à 7,6	6,6
De 7,6 à 7,8	4,8
De 7,8 à 8,0	3,2

Comme le ρH est environ 8,8 au moment où tout le phosphate mono est passé à l'état de diphosphate, on n'aurait en outre à saturer entre 8,0 et 8,8 que 6,40 p. 100 du mélange; les quantités de soude à ajouter continueraient donc encore à aller en diminuant entre 8,0 et 8,8. Ainsi la saturation des phosphates primaires consomme beaucoup plus de bicarbonate de soude entre 7 et 7,4 qu'entre 7,4 et 7,8 et surtout qu'au delà de 8,0. Voilà pourquoi les quantités de bicarbonate restent faibles au-dessous de 7,4 et croissent notablement au-dessus de 8,2.

Mais il ne suffit pas de mettre en présence les quantités convenables de bicarbonate de soude et de phosphate primaire, pour que la réaction passe immédiatement au ρH d'une solution équivalente de phosphate secondaire. Si le dixième environ du bicarbonate présent réagit, pour amener 100 cent. cubes de mélange de phosphates de $\rho\text{H} = 7,4$ à $\rho\text{H} = 7,5$, il faudra, d'après le tableau précédent, 66 cent. cubes de solution de bicarbonate de même concentration. Après la réaction, il en resterait $66 - 6,6 = 59,4$ cent. cubes. Or, pour passer de 7,6 à 7,8, il ne faut que 48 cent. cubes et ainsi de suite. Il y aurait donc, dès le premier déplacement du ρH vers l'alcalinité, la quantité de bicarbonate nécessaire pour transformer tout le phosphate primaire en secondaire. Il semble que cette transformation existe en effet, au moins pour la plus grande partie, comme le prouve l'expérience suivante : A 100 cent. cubes de solution $n/75$ de phosphate monopotassique, amenée par addition de soude $n/10$ à $\rho\text{H} = 7,05$, on ajoute 48 cent. cubes de solution de bicarbonate de soude $n/10$. Le ρH passe à 7,95. On fait le vidé en chauffant légèrement, à 30° au plus. Il se dégage du CO_2 et le ρH passe à 8,4. Donc la décomposition du bicarbonate par le phosphate primaire va plus loin que ne l'indique le ρH . Mais l'existence du phosphate secondaire est masquée par la présence de CO_2 , qui déplace la réaction du milieu vers l'acidité. C'est ainsi que dans nos cultures le ρH est voisin de 8,5

au moment où l'on recueille la toxine. En chassant l'acide carbonique par le vide, ou simplement en plaçant la toxine dans l'étuve quelques jours, le pH passe aux environs de 8,9, c'est-à-dire que le phosphate ne peut y exister qu'à l'état de diphosphate. Il s'établit donc dans les cultures un certain équilibre entre les phosphates, les bicarbonates et l'acide carbonique, dont l'ionisation dépend elle-même de la concentration de CO_2 et de celle des bicarbonates; cet équilibre régit à chaque moment les pH observés (1).

En résumé, des quantités notables de bicarbonates se forment dans les cultures. Leur influence directe sur la réaction du milieu est minime. Mais ils font l'office de tampon à l'égard des acides organiques et ils transforment les phosphates primaires en secondaires.

Carbonates. — Nous n'avons trouvé de carbonates que dans un seul dosage. Le bouillon II, à l'origine, ne contenait pas de CO_2 libre; le CO_2 présent se répartissait entre CO^2NaH pour 49 milligrammes et CO^2Na^2 pour 230 milligrammes (2).

Le carbonate de soude a sur la réaction du milieu une influence qui se rapproche beaucoup plus de celle de la soude que de celle du bicarbonate de soude. Pour amener 5 cent. cubes de solution $n/75$ de phosphates, contenant en outre 2 p. 100 de peptone Chapoteaut, d'un pH initial 7,0 à pH 8,0, il faut 0 c.c. 66 de $NaOH$ $n/10$, 1 c.c. 25 de CO^2Na^2 $n/10$ et 3 c.c. 40 de CO^2NaH $n/10$. Dans notre bouillon II, le pH initial était 8,0; après deux jours de culture, il était passé à 7,55. A ce moment, au lieu des 230 milligrammes de CO_2 en CO^2Na^2 et 49 milligrammes en CO^2NaH de l'origine, il y avait 415 milligrammes en CO^2NaH et 370 milligrammes en CO_2 libre. Il est évident que la production de CO_2 entraînait dans ce cas un retour de la réaction vers l'acidité.

(1) Le système bicarbonate de soude et mélange de phosphates est donc un amortisseur exceptionnellement puissant des changements de réaction.

(2) Dans le bouillon VI, plus alcalin cependant, un dosage fait au jour de la préparation n'indiquait ni carbonate, ni bicarbonate, ni CO_2 libre; tout CO_2 avait dû être chassé, soit au moment du premier chauffage de la macération de viande et de la solution de peptone, avant alcalinisation, soit pendant les stérilisations, par réaction des phosphates, acides aminés, peptones sur le bicarbonate ou le carbonate qui pouvait exister. Dans le ballon qui a servi à nos expériences, le dosage n'a été fait que dix jours plus tard, et nous avons trouvé 276 milligrammes de CO_2 libre. Cet acide carbonique avait sans doute été pris à l'air atmosphérique dans l'intervalle.

II. — Acides organiques.

TECHNIQUE. — Ne pouvant songer à doser les acides volatils et fixes sur moins d'un litre de milieu de culture, nous avons dû préparer des séries de ballons du même bouillon et faire sur des ballons différents les dosages avant l'ensemencement, puis, après deux, quatre, six, dix jours, etc. de culture. Le développement du bacille diptérique sur le bouillon Martin a un caractère si régulier et si constant, que l'on ne commet pas une grande erreur en raisonnant sur les chiffres obtenus avec une série de ballons comme s'il s'agissait de prélèvements successifs dans la même culture.

La culture était filtrée sur bougie au jour voulu. On mesurait exactement un litre, évaporait à sec dans le vide après addition de 3 grammes de chaux pure pulvérisée, reprenait par un peu d'eau et évaporait à sec une seconde fois. Puis le résidu était repris par environ 100 cent. cubes d'eau, le dépôt séparé et lavé par centrifugation. Au liquide clair on ajoutait un petit excès d'une solution à 40 p. 100 d'acide tartrique. Après cristallisation du tartrate de calcium, le filtrat, additionné d'environ 2 c. c. 5 de solution d'acide tartrique à 40 p. 100, était soumis à l'entraînement par la vapeur d'eau, et les acides volatils titrés à l'eau de chaux, jusqu'à ce que 100 cent. cubes de distillat soient neutralisés par moins de 0 c. c. 5 d'eau de chaux. Cette distillation dure environ quinze heures.

La solution des sels de chaux était ensuite concentrée dans le vide à 200 cent. cubes. Sur 100 cent. cubes débarrassés du calcium, on dosait l'acide formique par réduction du bichlorure de mercure, suivant la technique décrite récemment par Auerbach et Zeglin (1). Celle de Franzen et Eggers, suivie par la plupart des auteurs, ne convient pas pour les quantités de 10 à 50 milligrammes environ d'acide formique que nous avions à doser dans nos cultures. Les essais témoins montrent que les chiffres obtenus sont trop faibles, la réaction n'étant complète qu'en milieu très légèrement acide (acétate de soude, plus 1 cent. cube de HCl n/1).

Les autres 100 cent. cubes servaient au dosage du reste des *acides volatils* par la méthode de Duclaux. Cette méthode ne donne de résultats vraiment satisfaisants que pour les mélanges de deux acides. Lorsque le produit examiné en renferme trois ou quatre, comme dans notre cas, il y a des entraînements d'un acide par un autre et les tables de Duclaux ne sont plus tout à fait exactes. Nous avons cherché à faire une estimation à peu près correcte par des approximations successives. Les trois premières portions passées à la distillation étaient redistillées en recueillant et titrant de nouveau séparément les fractions, puis les trois premières portions de cette seconde distillation distillées une troisième fois. En supposant que les divers acides se répartissent entre les dix fractions de chaque distillation selon les proportions données dans la table de Duclaux, les trois premières fractions de la troisième distillation contiennent 33,57 p. 100 de l'acide valérianique total, 10,30 p. 100 de l'acide butyrique, 3,75 p. 100 de l'acide propionique, 0,65 p. 100 de l'acide acétique et 0,14 p. 100 de l'acide formique. D'autre part, les deux dernières portions de la première distillation étaient également

(1) AUERBACH et ZEGLIN. *Zeit. f. physikal. Chemie.*, 103, 1922, p. 161 et *Arbeit. a. d. Reichsgesundheitsamte*, 53, 1922-1923, p. 633.

redistillées. Les quantités recueillies étaient trop faibles pour permettre de distiller une troisième fois les deux portions de queue. En appliquant à ces deux portions le même calcul qu'aux portions de tête, on trouve qu'elles renferment 0,029 p. 100 de l'acide valérianique, 0,49 p. 100 de l'acide butyrique, 1,96 p. 100 de l'acide propionique, 5,06 p. 100 de l'acide acétique et 4,2 p. 100 de l'acide formique.

Avant d'utiliser ces données pour procéder aux calculs, nous avons cherché à déterminer, par des réactions qualitatives, les acides présents dans les diverses fractions. Nous avions en même temps, par ces essais, une indication quantitative grossière, en cherchant, d'une part, la limite de sensibilité des réactions employées, et d'autre part, la plus petite quantité de nos distillats (débarrassés au préalable du calcium) qui donnait une réaction de même intensité. Pour l'acide acétique, la réaction de l'oxyde de cacodyle est nettement perceptible pour 1/20^e de milligramme; mais en présence d'un grand excès d'acide butyrique, l'odeur est altérée ou masquée et l'appréciation quantitative devient fantaisiste. Pour l'acide butyrique, nous utilisions la réaction indiquée par H. Agulhon (1): ajouter à 1 cent. cube de liquide une goutte de solution très diluée de FeCl_3 et agiter avec 1 cent. cube d'éther acétique. Le précipité passe dans l'éther acétique à partir de doses voisines de 2 milligrammes, ou plus élevées s'il y a en même temps une quantité notable d'acide acétique. L'acide propionique donne la même réaction, mais avec des doses de 4 à 5 milligrammes seulement. D'autre part, en opérant de la même manière avec quelques gouttes d'une solution de sulfate de cuivre à 2 p. 100 et 1 c. c. 5 d'éther ordinaire, au lieu du chlorure ferrique et de l'éther acétique, on voit le butyrate passer totalement dans l'éther, pour des doses voisines de 10 milligrammes. Mais on n'obtient pas de réaction avec l'acide propionique. Si donc un échantillon donne les deux réactions, fer et éther acétique, cuivre et éther, pour des volumes qui sont entre eux dans le même rapport que la sensibilité de ces réactions, il est probable qu'il ne contient que de l'acide butyrique. Si la réaction au fer est donnée par un volume relativement plus faible, il doit y avoir aussi de l'acide propionique. Ce procédé, bien imparfait, est le seul que nous ayons trouvé avec l'interprétation des courbes de distillation des acides, pour juger de la présence de l'acide propionique. Nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants, dans des mélanges artificiels analogues aux nôtres, avec les quelques réactions de l'acide propionique qui sont mentionnées dans la littérature. Enfin pour l'acide valérianique, dont la présence était vraisemblable à la fin des cultures, d'après les proportions d'acide qui passaient dans les fractions de tête, nous avons utilisé la faible solubilité du sel d'argent. En ajoutant à un mélange de 20 milligrammes environ d'acide butyrique et 2 milligrammes d'acide valérianique, sous un volume de 4 à 5 cent. cubes, 4 à 5 cent. cubes de solution AgNO_3 de nitrate d'argent, on observe un trouble beaucoup plus marqué que dans une solution d'acide butyrique seul, de même concentration.

En possession de tous ces éléments, nous avons d'abord calculé les quantités d'acide formique qui devaient passer dans les diverses fractions recueillies et nous les avons déduites de ces fractions. Puis nous avons calculé l'acide acétique d'après les deux dernières fractions de queue. Du chiffre obtenu nous avons déduit ce qui devait passer dans les trois dernières frac-

(1) H. AGULHON. *Bull. des Sciences pharmacologiques*, 20, avril 1913, p. 205.

tions de tête, puis calculé d'après les chiffres ainsi corrigés de ces trois dernières fractions l'acide butyrique et éventuellement l'acide valérianique. Il faut ensuite faire une correction au chiffre d'acide acétique pour la quantité d'acide butyrique qui a dû passer dans les deux dernières fractions de queue, et rectifier à son tour le calcul de l'acide butyrique d'après le chiffre définitif d'acide acétique. L'acide propionique n'a jamais pu être mis en évidence.

Dans ces calculs par approximation, on aboutit à des chiffres un peu trop forts pour les acides acétique et butyrique, sans doute parce que, dans les mélanges complexes, il y a des entraînements réciproques. En effet, les totaux obtenus deviennent un peu supérieurs au chiffre de la première distillation globale dans la vapeur, et à ceux du premier dosage par la méthode de Duclaux. Quand l'erreur dépassait environ 1 p. 100, nous avons introduit encore une correction d'après le calcul des proportions des deux acides, tirées des chiffres obtenus dans ce premier dosage, déduction faite des acides formique et valérianique. Nous espérons avoir atteint par cette méthode le degré d'exactitude que le sujet pouvait comporter.

Le dosage des acides fixes était plus simple. Après l'entraînement par la vapeur des acides volatils, le liquide de culture, contenant en outre l'acide tartrique ajouté pour libérer ces acides, était concentré à sirop épais, puis additionné d'une quantité suffisante de sable de Fontainebleau calciné et lavé à l'acide chlorhydrique. La pâte obtenue était desséchée à fond, d'abord au bain-marie, puis dans le vide sur l'acide sulfurique, pulvérisée, séchée à nouveau dans le vide, épuisée par l'éther au Soxhlet. La solution aqueuse des acides extraits par l'éther (qui n'entraîne pas d'acide tartrique) était titrée à l'eau de baryte $n/10$. On dosait ensuite l'acide lactique par la méthode de Möslinger (1). La solution des sels de baryum, concentrée à quelques centimètres cubes, était additionnée d'une quantité d'alcool fort suffisante pour obtenir un degré alcoolique de 75 environ. Après quelques heures de repos, les sels de baryum se déposent, sauf le lactate qui est soluble dans l'alcool de cette concentration. On filtre, lave le filtre à l'alcool, évapore le filtrat à sec, calcine le résidu et dose l'alcalinité de la cendre, en dissolvant dans l'acide chlorhydrique $n/10$ et titrant en retour en présence de méthylorange. L'acide chlorhydrique employé à neutraliser la cendre correspond à l'acide lactique qui était combiné au Ba. Nous nous sommes assurés que quelques gouttes des filtrats alcooliques donnaient une réaction de Hopkins intense. Quant aux autres acides fixes, les quantités, calculées par différence d'après la baryte employée à neutraliser le total, ne dépassaient jamais quelques centimètres cubes $n/10$ par litre. Elles étaient trop faibles pour permettre une analyse quantitative et même qualitative. Nous avons obtenu, avec certaines cultures, faiblement la réaction du pyrrol, qui est donnée par l'acide succinique, mais n'est pas spécifique. C'est la seule indication positive que nous ayons sur ces acides, dont le rôle est à peu près négligeable.

Le tableau IV indique les quantités d'acides, volatils et fixes, en centimètres cubes $n/10$ par litre, que nous avons trouvées dans 3 bouillons ordinaires du service de Sérothérapie, ajustés au voisinage de $pH = 8,0$, et dont la toxine

(1) MÖSLINGER. *Handbuch d. biochemischen Arbeitsmethoden*, 2, 1910, p. 30.

tuaient le cobaye de 350 grammes à la dose de 1/700 de cent. cube pour le second, 1/1.000 de cent. cube pour le premier et le troisième.

TABLEAU IV. — **Acides organiques en centimètres cubes**
n/10 par litre.

AGE de la culture	I		II		III	
	pH	cent cubes <i>n/10</i>	pH	cent. cubes <i>n/10</i>	pH	cent. cubes <i>n/10</i>
Origine	8,05	131,50	8,05	131,95	8,40	163,20
2 jours	7,50	141,60	—	—	7,65	214,80
4 jours	—	—	7,90	157,40	7,75	215,50
6 jours	8,10	94,45	—	—	7,90	158,70
10 jours	—	—	8,50	74,80	8,50	142,10
20 jours	8,70	48,30	—	—	—	—

Ces acides organiques totaux présents dans le milieu de culture correspondent à l'origine à des solutions de concentration *n/61* à *n/76* environ, et pèsent en chiffres ronds 1 gramme par litre. Ils augmentent vivement dans les deux premiers jours, encore un peu jusqu'au quatrième jour, puis déclinent, plus ou moins rapidement, jusqu'à la fin de la période d'activité. Mais cet aperçu général ne donne qu'une idée imparfaite de la réalité. La destruction et la production d'acides est certainement simultanée, surtout les premiers jours, et même sans doute jusqu'à la fin. Nous discuterons de plus près cette question dans notre mémoire sur la production de CO_2 par le bacille diphtérique. Pour le moment, il suffit d'établir le principe, qui ressort avec évidence d'un simple coup d'œil sur les quantités des divers acides volatils, recueillies dans les analyses successives du même bouillon. Nous donnons dans le tableau V les chiffres des acides volatils du bouillon III du tableau précédent, avec la proportion de chacun d'eux dans le mélange.

TABLEAU V. — **Acides volatils en milligrammes par litre et pourcentages en centimètres cubes *n*/10.**

AGE de la culture	ACIDE FORMIQUE		ACIDE ACÉTIQUE		ACIDE BUTYRIQUE		ACIDE VALÉRIANIQUE	
	milligrammes	cent. cubes <i>n</i> /10 p. 100	milligrammes	cent. cubes <i>n</i> /10 p. 100	milligrammes	cent. cubes <i>n</i> /10 p. 100	milligrammes	cent. cubes <i>n</i> /10 p. 100
Origine. . . .	50	8,4	307,3	39,8	585,8	51,7	—	—
2 jours	65,6	7,0	565,9	46,2	832,4	46,7	—	—
4 jours	178,8	19,5	443,2	37,0	763,6	43,5	—	—
6 jours	200,8	30,6	206,8	24,2	566,4	45,1	—	—
10 jours	232,4	44,9	traces	—	459,2	46,4	58,8	8,6

Ce bouillon, par comparaison avec d'autres, est caractérisé par la forte production d'acides formique et butyrique et la disparition relativement plus lente de l'acide acétique. La marche de la production et la disparition des acides a dans tous les bouillons la même allure : consommation élective et à peu près totale de l'acide acétique ; augmentation, parfois moins régulièrement progressive que dans le bouillon III, de l'acide formique ; production forte et destruction partielle de l'acide butyrique. Il est certain que la production d'acides organiques masque la destruction dans les premiers jours, où elle prend le dessus ; et inversement que la destruction masque la production, qui devient faible, au delà du quatrième jour. Il n'est pas vraisemblable, en effet, que l'acide acétique tombe de 443 à 206 milligrammes du quatrième au sixième jour et n'ait pas été touché auparavant ; ni que l'acide formique soit le seul produit du métabolisme microbien, avec un peu d'acide valérianique, au delà du quatrième jour.

Des acides fixes, il y a peu de chose à dire. Ils ne forment que 6 à 12 p. 100 des acides totaux ; la plus grande partie est de l'acide lactique, dont les quantités oscillent d'un jour à l'autre. En général, la destruction l'emporte sur la production :

exceptionnellement dans le bouillon III, il s'est accru de 445 à 196 milligrammes par litre entre le sixième et le dixième jour.

Quel est le rôle des acides organiques dans les changements de réaction du milieu ?

1^o Dans les premiers jours, quand la production l'emporte sur la destruction, ils déplacent le *pH* vers l'acidité. C'est ce qui se passe certainement dans les milieux dont le *pH* est supérieur à 7,0. En est-il de même dans les milieux ajustés à l'origine à une réaction acide ? Nous n'avons malheureusement pas analysé, dans les premiers jours de la culture, de bouillon ajusté au-dessous de 7,0.

2^o La destruction des acides organiques contribue à l'alcalinisation. À l'état libre, ils sont transformés en CO_2^* , dont l'influence sur le *pH* est bien moindre que la leur; à l'état de sels, ils fournissent des bicarbonates, dont nous avons étudié le rôle. Le second cas est de beaucoup le plus général. Il se présente seul en milieu alcalin, et reste le plus fréquent en milieu acide. Nous avons calculé, en effet, d'après les tables de Walpole (1), qui donnent le *pH* de mélanges d'acide acétique et acétate de soude, les chiffres suivants :

ACIDE ACÉTIQUE (milligrammes par litre)	ACÉTATE DE SOUDE (milligrammes par litre)	pH
4,5	161	6,518
3,0	159	6,211
4,5	157	6,024

Les quantités d'acide acétique contenues dans l'acétate de soude sont respectivement de 448, 116 et 114 milligrammes. On voit que, pour les *pH* qui nous intéressent (dans l'eau pure), la presque totalité de l'acide acétique est à l'état d'acétate. Nous dirons donc seulement pour mémoire que, si l'on ajoute à un bouillon ajusté à *pH* = 7,0 une quantité d'acide acétique correspondant à 430 cent. cubes par litre d'acide *n*/10, chiffre moyen de nos bouillons à l'origine, le *pH* tombe au voisinage de 6,0, un peu au-dessous. On ne peut pas, en effet, en déduire que le *pH* d'un bouillon ajusté à 6,0, et contenant cette quantité d'acides organiques, passerait à 7,0, simplement par la destruction de ces acides. Cette action directe ne s'exerce que

(1) WALPOLE. *Journ. Chem. Society*, **105** (2), 1914, p. 2509.

sur la partie libre des acides organiques. Pour le surplus, ce sont leurs sels qui, comme au-dessus de $\rho\text{H} = 7,0$, sont d'abord transformés en bicarbonates. Il n'en reste pas moins que la destruction de ces acides organiques combinés fait passer le Na qu'ils fixaient sur les phosphates acides, par l'intermédiaire des bicarbonates. La preuve qu'une partie des acides organiques existe à l'état de sels, au-dessous de $\rho\text{H} = 7,0$, est donnée par le fait que dans les bouillons, ajustés au départ au-dessous de 7,0, nous trouvons du bicarbonate de sodium, une fois la réaction devenue alcaline : il restait donc encore des sels d'acides organiques au moment où le point neutre a été traversé.

3° La production d'acides organiques, au cours du développement et jusqu'au delà du dixième jour, explique la diminution des bicarbonates que nous avons constatée à certaines dates dans l'évolution de nos cultures.

La présence de sels d'acides organiques dans le milieu de culture est donc importante. Ces sels fournissent, d'une part, un aliment de choix au microbe, du moins dans les limites des doses qui existent dans nos bouillons; ils contribuent, d'autre part, à régulariser la marche de la réaction du milieu. N'y a-t-il pas une illustration de ce fait dans l'observation suivante de Th. Smith (1) : Un bouillon peptoné, dont le sucre a été détruit par fermentation au colibacille, additionné ensuite de 0,6 p. 100 de glucose, est faiblement alcalin à la phthaléine au septième jour et produit une bonne toxine. Le même bouillon, non fermenté, ne contient que 0,1 p. 100 de sucre musculaire;ensemencé sans addition de glucose, il reste beaucoup plus acide que le précédent, et donne une mauvaise toxine. C'est probablement que la fermentation par le colibacille, suivie de neutralisation au carbonate de soude, a laissé dans le milieu des sels d'acides organiques. Les acides qui résultent de la fermentation du glucose ajouté au premier bouillon, étant produits progressivement en milieu déjà alcalin, passent par fractions successives par la forme de bicarbonate et finissent par s'éliminer en CO_2 sans contrarier le succès de la culture.

(1) TH. SMITH. *Journ. of experimental med.*, 4, 1899, p. 373 et suivantes.

III. — L'alcalinisation du milieu.

Il existe dans le bouillon Martin de l'ammoniaque ou des sels ammoniacaux; il s'en produit en outre pendant la culture. Nous les avons dosés ensemble, simplement par distillation de 40 cent. cubes de liquide sur la magnésie fraîchement calcinée, dans l'appareil d'Aubin. Les comparaisons que nous avons faites, dans les essais préliminaires, avec le dosage par la méthode de Folin ou la distillation dans le vide à basse température, n'ont pas fait apparaître de différence notable.

Nous donnons dans le tableau VI les quantités de NH_3 , en milligrammes par litre, recueillies à l'origine, puis dans les dosages successifs, pour les mêmes bouillons qui ont servi à l'étude de CO_2 et des bicarbonates. Nous avons noté pour chaque bouillon, dans une colonne distincte, les quantités de NH_3 produites par le bacille, seule donnée intéressante au point de vue des changements de $p\text{H}$.

On remarque dans ce tableau que :

1^o Une production d'ammoniaque déterminée n'entraîne pas une variation de $p\text{H}$ déterminée. Par exemple le bouillon I passe de $p\text{H}$ 6,70 à 7,50 (différence 0,80) pour une production de 83 milligrammes de NH_3 , et le bouillon IV de $p\text{H}$ 6,60 à 7,35 (différence 0,75) pour une production de 97 milligrammes. Le bouillon II passe de $p\text{H}$ 7,55 à 8,60 (différence 1,05) pour une production de NH_3 de 122 milligrammes et le bouillon VI de $p\text{H}$ 7,50 à 8,40 (différence 0,90) pour une production de 143 milligrammes.

2^o Les quantités de NH_3 produites après le même temps ne sont pas sous la dépendance du $p\text{H}$ initial et n'ont pas de rapport direct avec le $p\text{H}$ atteint. Dans nos bouillons, dont le $p\text{H}$ initial forme une série de termes croissant de 6,1 à 8,25, au sixième jour les quantités de NH_3 produites sont respectivement 136, 97, 86, 49 et approximativement 100 milligrammes et les $p\text{H}$ 7,05, 7,35, 7,95, 7,85 et 7,55. Si l'on calcule la production quotidienne de NH_3 dans les deux premiers jours, on trouve les chiffres suivants :

TABLEAU VI. — NH_3 en milligrammes par litre.

AGE de la culture	I			IV			VIII			II			VI			
	pH	NH ₃ total	NH ₃ produit	pH	NH ₃ total	NH ₃ produit	pH	NH ₃ total	NH ₃ produit	pH	NH ₃ total	NH ₃ produit	pH	NH ₃ total	NH ₃ produit	
Origine . . .	6,40	204	—	6,60	235,6	—	6,75	165,7	—	8,0	184,1	—	8,25	471,3	—	
2 jours . . .	—	—	—	6,65	342,2	56,6	7,05	204,4	35,7	7,55	220,8	36,7	7,50	226,6	35,3	
4 jours . . .	6,70	316,2	142,2	6,80	337,0	81,4	7,40	211,6	45,9	—	—	—	7,50	253,7	82,4	
6 jours . . .	7,0 . . .	340,4	136,4	7,3 ¹	352,6	97,0	7,95	232,3	86,6	7,85	233,3	49,2	—	—	—	
7 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7,60	289,1	117,8	
8 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
10 jours . . .	7,45	375,0	171,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
11 jours . . .	—	—	—	8,10	372,3	146,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
12 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
14 jours . . .	7,50	399,6	195,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
16 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
19 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
21 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
30 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8,45	316,6	
32 jours . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
33 jours . . .	7,75	547,0	313,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8,60	342,5	158,4

	pH	NH ³ en milligrammes
I	6,1	28,0
IV	6,6	28,3
VII	7,2 ⁵	28,1
VI	8,2 ⁵	27,6
VIII.	6,7 ⁵	27,9
II.	8,0	28,3

Il semblerait, d'après le tableau VI, que le bouillon I ait compensé son acidité initiale par une production de NH³ supérieure à celle des autres. Mais dans une autre série de cultures, nous avons trouvé, au trentième jour, les valeurs suivantes :

	pH initial	NH ³ (en milligrammes) produit
A.	5,8	312
B.	6,9	325
C.	7,0	215
D.	7,8	287
E.	8,6	245

Il apparaît bien que les petites différences observées entre les bouillons relèvent d'autres causes que le pH initial.

Nous avons montré, dans le travail auquel celui-ci fait suite, que pour amener un déplacement déterminé de la réaction vers l'alcalinité, il fallait ajouter à un bouillon plus de NH⁴OII que l'analyse n'en fait découvrir dans les cultures. Nous reprendons avec plus de précision un de nos exemples. Dans un milieu ajusté à pH = 6,9, puis mis en culture, on avait cherché, avant l'ensemencement et après 2 périodes de quelques jours, quelles quantités de NH⁴OII il fallait ajouter pour obtenir une certaine variation de pH. Ces points atteints, on avait dosé l'ammoniaque sur un échantillon prélevé. Voici les écarts constatés :

VARIATION DE pH	NH ³ TROUVÉ en milligrammes	NH ³ A AJOUTER en milligrammes
6,9 à 7,7	70	187
7,7 à 8,3	100	102
8,3 à 8,4	45	34
Totaux	215	323

On voit que dans la zone de 7,7 à 8,3 il peut y avoir concordance entre les deux déterminations ; au-dessus de 8,3 l'ammo-

niaque peut être partiellement neutralisée, sans doute par CO_2 ; enfin c'est dans la zone inférieure à 7,7 que l'écart est le plus considérable, et par suite que d'autres influences contribuent le plus largement à l'alcalinisation. C'est aussi celle dans laquelle la neutralisation des phosphates par les bicarbonates est la plus active.

Ce que nous avons exposé dans les deux premières sections de ce mémoire nous dispense de longs développements au sujet des causes qui concourent à l'alcalinisation des cultures :

1^o Disparition d'acides organiques libres, au-dessous du point neutre. Diminution de CO_2 dissous, dans la seconde quinzaine de culture.

2^o Présence de bicarbonate de soude, dont l'influence directe est toutefois minime.

3^o Transformation des phosphates primaires en phosphates secondaires par l'intermédiaire des bicarbonates. Ce dernier point appelle quelques considérations complémentaires.

Dans une vieille culture, après avoir au besoin chassé CO_2 dissous, on trouve toujours *pH* voisin de 8,8 à 8,9. Dans ces conditions, tout l'acide phosphorique est à l'état de phosphates secondaires. Le milieu de culture contenait-il assez de Na disponible pour transformer tout le phosphate primaire en secondaire?

Il y existe une réserve Na fixée sur les peptones. Les quantités qu'elle peut fournir aux phosphates sont toutefois très faibles. Il ne saurait être question de réaction directe du phosphate primaire sur les peptones : lorsqu'on ajuste un milieu à un *pH* quelconque, 8,0 par exemple, il faut y ajouter assez de soude pour compenser l'acidité à la fois des deux éléments. On réalise un équilibre, qui ne saurait être modifié sans qu'il y ait intervention d'une cause étrangère, agissant soit sur l'un des termes, soit sur l'autre. Mais l'acide carbonique pourrait-il déplacer Na des peptones, et former du bicarbonate ? Cela ne paraît pas vraisemblable. Ajustons à $\text{pH}=8,0$ une solution de peptone et introduisons une quantité de CO_2 , qui fait tomber le *pH* à 6,5. En faisant bouillir, on chasse tout le CO_2 ; le *pH* revient à 8,0. S'il s'était formé du bicarbonate, il devrait rester après l'ébullition un peu de carbonate; en chauffant en présence d'acide sulfurique, on

dégagerait une nouvelle quantité de CO_2 ; or l'expérience donne un résultat entièrement négatif. Au contraire, si l'on fait bouillir une solution de bicarbonate de soude en présence de peptone, il se dégage plus de CO_2 que dans l'eau pure.

Deux fractions des peptones peuvent cependant abandonner au milieu un peu de Na : celle qui entre dans la constitution des corps microbiens, et celle qui donne naissance, comme nous le montrerons ultérieurement, à des acides organiques, et par suite à du bicarbonate de soude. On peut se faire une idée très approximative de l'importance de ces deux sources de Na, d'après les $p\text{H}$ des solutions de glycocolle et soude étudiées par Sörensen (1). Une solution de glycocolle $n/10$, à 7,505 grammes par litre, a un $p\text{H}=6,106$; en ajoutant à 10 cent. cubes 0 c.c. 1 de $\text{NaOH } n/10$, on obtient la valeur $p\text{H}=7,809$; avec 0 c.c. 25 de $\text{NaOH } n/10$, la valeur $p\text{H}=8,237$. Donc pour ajuster autour de 7,8 à 8,0 une solution de $p\text{H} 6,0$ (ce qui est à peu près l'acidité d'une solution à 2 p. 100 de peptone Chapoteaut), il faudrait de 1 à 1 c.c. 5 de soude $n/1$ par litre, soit 23 à 34 milligr. 5 de Na. Les corps microbiens, lorsqu'on arrête les cultures, renferment environ 0 gr. 7 de protéine qui, sous la forme de glycocolle, exigeraient seulement 2 à 3 milligrammes de Na. Quant au milieu de culture, il contient au plus 25 grammes de protéines par litre, qui fixeraient environ 70 à 100 milligrammes de Na. Mais les protéines ou peptones ont un poids moléculaire beaucoup plus élevé que le glycocolle et leur caractère acide est en outre en général moins marqué. Comme le bacille ne consomme pas plus du dixième des protéines du milieu, Na provenant de ces origines ne doit pas dépasser 10 milligrammes par litre.

Les sels de sodium des acides organiques sont la source principale de Na pour neutraliser les phosphates acides. Dans les 3 bouillons du tableau IV, il avait disparu respectivement 83 cent. cubes d'acide $n/10$ au vingtième jour, 57 et 21 cent. cubes au dixième jour.

Les sels de sodium correspondant contenaient 190, 134 et 48 milligrammes de Na. D'autre part, un mélange de phosphates $n/75$, concentration de nos bouillons, exige pour être trans-

(1) SÖRENSEN. *C. R. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg*, 1909, p. 41.

formé entièrement en phosphates secondaires 271 milligrammes quand le *pH* est 6,0, 124 milligrammes quand le *pH* est 7,0 et 19,6 milligrammes seulement quand le *pH* est 8,0. On voit que, dans les bouillons alcalins au départ, il existe certainement une quantité de Na suffisante pour faire le diphosphate. Dans un bouillon à 6,0, le fait est moins certain. Il est vrai que notre bouillon I des tableaux I et III, ajusté à 6,10, n'a atteint que le *pH* 7,75. Mais nous avons vu des bouillons aussi acides arriver à 8,50 et au delà. Y avait-il dans ces bouillons une réserve plus abondante, ou y a-t-il eu une consommation plus complète des acides organiques ? L'ammoniaque contribue-t-elle dans ces cas à neutraliser l'acidité des phosphates ? Il est certain que, dans l'évolution de la culture, l'ammoniaque détermine à certains moments le déplacement de la réaction vers l'alcalinité. Il ne paraît pas cependant qu'il y ait eu en général beaucoup d'ammoniaque libre. Elle doit neutraliser, outre éventuellement les phosphates, l'acide carbonique ionisé et l'acidité des peptones.

Il nous reste à vérifier si l'on peut amener un bouillon donné à un *pH* déterminé, en ajoutant les quantités d'ammoniaque et de bicarbonate de soude trouvées quand ce *pH* a été atteint, plus la soude nécessaire pour transformer le monophosphate en diphosphate. Pour un bouillon mis en culture à *pH* = 6,6, nous faisons l'expérience avec les données fournies par l'analyse quand *pH* a atteint 7,6 ; nous obtenons *pH* = 7,6. Nous répétons l'essai quand le *pH* est à 8,4 : nous n'obtenons cette fois que 8,25. Il y a en outre à tenir compte du CO_2 dissous dans la culture, qui suffisait à abaisser les *pH* respectivement à 6,85 et 7,30. Aussi, croyons-nous que, comme nous l'avons expliqué plus haut, l'équilibre entre CO_2 et les phosphates secondaires est tel que l'acidité de l'acide carbonique ionisé masque l'existence d'une proportion de phosphate secondaire, supérieure à celle qui possède la réaction observée.

Conclusions.

Le bacille diptérique cultivé dans le bouillon Martin produit des quantités importantes de CO_2 . Il s'en dégage plus de la moitié pendant la culture ; le reste est, par fractions presque

égales, dissous dans le milieu ou combiné sous la forme de bicarbonates. Ces bicarbonates proviennent de la destruction des sels d'acides organiques.

L'acide carbonique dissous est partiellement ionisé et peut produire des déplacements de la réaction vers l'acidité supérieurs à 1,0 de ρH .

Mais il n'y a pas de relation définie entre le ρH à un moment donné et la quantité de CO_2 dissoute.

L'influence directe des bicarbonates sur la réaction du milieu est très faible. Leur rôle est de servir de tampon lorsque le métabolisme microbien produit des acides organiques, et surtout, de transformer les phosphates acides du milieu en phosphates secondaires.

Il existe dans le bouillon Martin environ 1 gramme par litre d'acides organiques, volatils dans la proportion de près des 9/10 ; ils sont à l'état de sels de soude dans les milieux alcalins et même pour une fraction importante dans les milieux acides. La présence de ces acides organiques, rapidement transformés en bicarbonates, est essentielle pour la marche de l'alcalinisation.

L'acide acétique est celui que le bacille diphtérique détruit de préférence ; l'acide formique est le plus résistant ; l'acide butyrique se place entre les deux, et sans doute l'acide lactique également.

Il y a dans la culture production et destruction simultanée d'acides. La production l'emporte dans les deux premiers jours ; il y a à peu près équilibre du deuxième au quatrième jour ; puis, la destruction prend le dessus. L'excès de la production sur la destruction dans les deux premiers jours explique, concurremment avec l'accumulation de CO_2 dans le milieu, la phase initiale d'acidification des cultures en milieu alcalin.

L'alcalinisation progresse par le concours de trois facteurs, dont le second agit surtout indirectement : la production d'ammoniaque, la conversion des sels d'acides organiques en bicarbonates et la transformation des phosphates primaires en secondaires. On peut, à l'aide de ces trois éléments et avec les doses qui existent dans les cultures, réaliser l'alcalinisation d'un bouillon neuf avec une approximation suffisante pour

qu'il ne soit pas nécessaire d'invoquer l'intervention d'une autre substance inconnue (1).

Le renversement de la réaction a lieu, dans les milieux alcalins à l'origine, lorsque la production d'acides organiques n'est plus assez forte pour annihiler l'effet des facteurs de l'alcalinisation.

Dans les milieux acides à l'origine, la phase d'acidification est supprimée pour deux raisons : 1^o La destruction rapide des acides organiques libres réduit d'autant l'acidité ; 2^o le bicarbonate de soude formé est immédiatement employé à neutraliser les acides nouvellement produits et les phosphates acides, au lieu de persister pour une partie dans le milieu.

La zone de *pH* de 7,0 à 7,4 environ constitue une région critique, parce que c'est celle où la saturation des phosphates acides consomme le plus d'alcali.

(1) Hypothèse de SIERAKOWSKI, *loc. cit.*

ÉTUDES SUR L'AUTOLYSE MICROBIENNE ACIDIFICATION PAR FORMATION D'ACIDE β -OXYBUTYRIQUE

par LEMOIGNE, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille.

Au cours d'études que je poursuis sur les fermentations provoquées par les microbes saprophytes les plus répandus dans les terres arables, j'ai été amené à cultiver certains organismes en quantités massives. J'ai reconnu que ces masses microbiennes, mises en suspension dans l'eau distillée stérile, à 30°, s'acidifient rapidement et avec intensité. J'ai étudié ce phénomène de plus près avec un bacille très voisin du *Bacillus Megatherium*, et j'ai constaté que, dans ce cas particulier, cette acidification est due, pour une grande part, à l'acide β -oxybutyrique



Déterminer les conditions dans lesquelles cette acidification se produit, établir qu'elle résulte d'un phénomène d'autolyse ; caractériser et doser les acides formés, et particulièrement l'acide β -oxybutyrique, sont les buts exclusifs que je me suis proposés dans ce travail.

Bien d'autres phénomènes se produisent au cours de cette acidification et j'ai signalé notamment la formation d'un corps cristallisé nouveau, dont la saponification donne un mélange d'acides β -oxybutyrique et α -crotonique [2] : je n'en parlerai pas dans ce mémoire. De même, je n'aborderai pas l'étude de l'origine chimique et de la signification physiologique des acides formés.

Bien que ce travail soit purement d'ordre analytique, il importe de situer exactement la question qui y est étudiée et d'indiquer les phénomènes plus généraux auxquels elle se rattache.

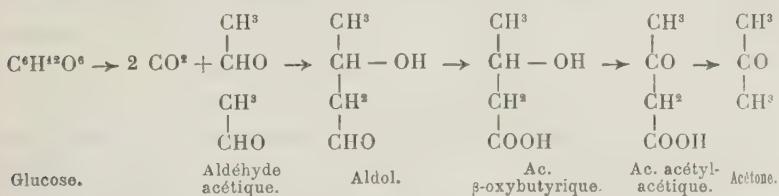
* * *

La production d'acide β -oxybutyrique par processus microbien n'a, à ma connaissance, encore jamais été observée. En 1922, A. Renshaw et Th. Fairbrother [3] signalent dans les cultures d'un microbe anaérobiose facultatif, de l'alcool butylique normal, de l'acétone et, en outre, des acides acétylacétique et β -oxbutyrique. Mais ces auteurs ne donnent aucune précision sur leur technique de caractérisation et notent simplement qu'ils ont décelé qualitativement ces deux acides dans le distillat des cultures. Or l'acide acétylacétique, instable, se décompose en acétone et acide carbonique par distillation :



Quant à l'acide β -oxybutyrique, il ne distille pas et s'accumule dans le résidu fixe. On ne peut donc pas trouver ces deux acides dans le distillat des cultures.

Par contre, si on n'a encore jamais caractérisé l'acide β -oxybutyrique dans les produits de fermentation, on a souvent admis sa formation au cours de la fermentation acétonique qui est très répandue. En effet, un des schémas les plus simples proposés pour expliquer la formation de l'acétone aux dépens des glucides par processus microbien est le suivant :



Mais cette production d'acide β -oxybutyrique par processus microbien est restée jusqu'à ce jour à l'état d'hypothèse.

Au contraire, il y a longtemps que les physiologistes ont démontré la formation de cet acide-alcool dans l'organisme des animaux supérieurs, soit à l'état physiologique, soit, surtout à l'état pathologique. L'acétone, l'acide acétylacétique et l'acide β -oxybutyrique, ont été étudiés dans un grand nombre de travaux sous la dénomination générale, et du reste impropre, de

« corps acétoniques ». J'en parlerai au sujet des méthodes de caractérisation et de dosage; mais n'ai pas à y insister ici, n'ayant pas à aborder l'étude du mécanisme chimique de la production de l'acide β -oxybutyrique. Je remarquerai simplement que, dans l'acidose comme dans l'autolyse microbienne que j'étudie, cette production apparaît comme une conséquence de l'inanition. Enfin, l'acidification que j'ai observée doit être rapprochée du phénomène extrêmement général de l'acidification *post mortem* de tous les tissus par processus autolytique.

Ce phénomène est considéré par les physiologistes et les médecins comme banal. En 1904, Brissemoret et Ambard ont proposé d'en faire un critérium de mort. « Le foie et la rate ont une réaction alcaline, appréciable au tournesol. Quelque temps après la mort, la réaction devient acide » [5]. En 1908, dans une excellente revue des travaux effectués sur l'autolyse des tissus, Launoy s'exprime ainsi : « S'il est un fait banal, c'est bien celui de l'acidification des tissus après la mort » [6]. Nicolle, en 1913, dans son travail général sur l'autolyse, signale également ce fait : « La réaction devient presque toujours acide » [7]. Le plus souvent, cette acidification est attribuée à la formation d'acide lactique par décomposition des glucides et plus particulièrement du glycogène.

Cependant, si l'on étudie en détail les très nombreux travaux chimiques ou biologiques poursuivis sur l'autolyse, on constate que peu d'auteurs ont décrit ou même signalé cette acidification et que ceux qui ont étudié avec précision la nature chimique des acides formés sont extrêmement rares.

Je n'ai pas ici à parler des travaux très nombreux et souvent très importants qui étudient spécialement les diastases autolytiques. Cependant, il en est, parmi eux, qui traitent particulièrement de l'influence de la réaction de milieu. J'espérais y trouver des renseignements concernant l'acidification *post mortem*. Schwiening [8] en 1894 montre l'action inhibitrice du carbonate de soude sur l'autolyse; Biindi [9], en 1896, signale l'influence favorable de l'acide chlorhydrique dilué. Avec du plasma isolé de tissus par la méthode de Buchner, Hedin et Rowland obtiennent des résultats de même ordre [10], Baer et Loeb [11], Schryver [12], Hedin [13], Dochez [14], Morse [15], précisent l'action des acides et des alcalis sur les diastases et

antidiastases des tissus. En 1918, enfin, Dernby [16] reprend cette question en utilisant la technique moderne pour la détermination de la concentration en ions H. Aucun de ces auteurs, qui cependant ne s'occupent que de la réaction de milieu, n'étudie l'acidification autolytique, qui fait varier considérablement la valeur de P_H.

On trouve quelques renseignements sur l'acidification autolytique dans les travaux plus spécialement chimiques, mais ils sont encore très rares et il faut attendre ces dernières années pour en obtenir de précis.

Thénard, Pasteur, considèrent l'autofermentation comme une continuation de la fermentation alcoolique des sucres aboutissant aux mêmes produits que celle-ci : alcool, acide carbonique, glycérine et acide succinique. Pour éviter l'intervention des bactéries, Béchamp qui étudie également la levure, la fait macérer à 25-30° dans de l'eau créosotée [17].

Il observe une solubilisation de la levure avec formation d'alcool, d'acide carbonique, d'acide acétique, d'une albumine, de leucine et de tyrosine, d'azote gazeux et, enfin, ce qui est important, de phosphates alcalins et alcalino-terreux solubles en proportions notables.

Schützenberger [18], en 1874, reprend le travail de Béchamp, qu'il confirme en grande partie, mais découvre en outre la formation de bases azotées du groupe de la sarcine. Il constate que le liquide provenant de la levure autolysée a une réaction légèrement acide, mais, pas plus que Béchamp, ne parle d'acidification.

Kossel, en 1882, trouve des résultats analogues à ceux de Béchamp et de Schützenberger, mais insiste sur la formation de phosphates solubles et montre que les bases azotées, telles que la xanthine, dérivent des nucléoprotéines [19].

Salkowski [20], Jacoby [21], etc., ne parlent pas d'acidification.

Schenk étudie l'autolyse de trois variétés de levure. Il ne signale pas d'acidification, mais constate, parmi les produits formés, quelquefois, de l'acide lactique et toujours de l'acide succinique [22].

Rettger, en 1905, dans un travail sur l'autolyse de la levure et des bactéries, insiste sur la formation d'acide phosphorique,

fait déjà signalé par Béchamp, Schützenberger et Kossel [23].

En 1906, Mochizuki et Arima signalent la formation d'acide lactique droit au cours de l'autolyse des tissus animaux [24].

Mazé et Perrier, reprenant les essais de Wehmer sur les citromycès considèrent que l'acide citrique formé par les penicillium, dérive de la substance protoplasmique même, c'est-à-dire est dû à un phénomène d'autolyse [25].

En 1913, Allilaire, dans des expériences sur le colibacille, observe la saponification des lipides avec mise en liberté des acides gras [26].

Pozerski signale, avec diverses bactéries, l'élimination d'acide phosphorique [27].

Molliard, en 1922, dans des recherches très voisines, constate, avec le *Sterigmatocystis nigra*, qu'il y a acidification en cas d'inanition : la nature de l'acide formé varie avec la nature de l'inanition, et l'on trouve tantôt de l'acide citrique, tantôt de l'acide glucosique et tantôt de l'acide oxalique [28].

Enfin, en 1923, Sevringshaus insiste sur l'acidification autolytique des tissus et cherche à déterminer quantitativement les acides formés [29]. « Après la mort, la concentration en ions H dans les cellules du foie augmente avec une rapidité explosive. Le maximum P_H 6 est atteint en vingt-quatre à quarante-huit heures. » D'après cet auteur, l'acidification, dans le cas de l'autolyse aseptique du foie est due surtout à la libération d'acide phosphorique, puis, et à un degré beaucoup moindre, à la formation d'acides gras, d'acide carbonique, et enfin d'acide lactique. Sevringshaus a recherché dans le tissu de foie autolysé l'acide β -oxybutyrique, mais ne l'a pas trouvé. Par contre, il considère qu'il y a formation d'un acide dont il n'a pu déterminer la nature chimique.

En résumé, on constate que l'acidification des tissus *post mortem*, qui semble être un fait absolument général, n'a pas été étudiée avec précision avant le travail de Sevringshaus et qu'elle paraît être due à la formation d'acides variés :

Acide acétique dans le cas de la levure.

Acide succinique dans le cas de la levure.

Acide lactique dans le cas de la levure et du foie.

Acide phosphorique dans tous les cas.

En outre, dans les cas d'inanition, les moisissures peuvent donner les acides citrique, *d*-glucosique et oxalique.

Le travail suivant comprend trois parties :

- I. Le bacille M et la technique employée;
- II. L'acidification autolytique;
- III. Les acides formés. L'acide β -oxybutyrique.

I. — Le bacille M et la technique bactériologique.

1° LE BACILLE M. — Ce bacille est extrêmement fréquent : je peux dire que je l'ai trouvé à peu près dans toutes les terres arables dont j'ai effectué l'analyse bactériologique à l'aide de milieux de culture additionnés de glucides. C'est dire que son rôle dans la nature ne doit pas être négligeable.

Ses propriétés morphologiques et culturelles le rapprochent beaucoup du *bacillus Megatherium* (de Bary). N'ayant pas poussé son étude bactériologique à fond, je ne puis l'identifier avec certitude et le désignerai simplement sous la dénomination de bacille M.

C'est un bacille sporulé, restant coloré par la méthode de Gram. Quelquefois isolées, quelquefois groupées par quatre, les cellules sont le plus souvent réunies par deux et disposées dans tous les sens. La largeur est d'environ 1 μ ; la longueur est variable : faible chez les microbes jeunes, elle peut atteindre 5 à 6 μ chez les individus plus âgés. Les spores ovales ont 0 μ 5 à 0 μ 6. L'intérieur de la cellule, surtout dans le cas de cultures âgées, est granuleux et présente des vacuoles.

La gélatine est rapidement liquéfiée. Sur gélose, si le milieu est favorable, la culture est très abondante; mucilagineuse au début, puis épaisse et crémeuse, elle coule dans le fond des tubes inclinés.

Le lait est coagulé, ou plutôt, la caséine en est précipitée, puis très vite liquéfiée et, contrairement à ce qui se produit avec la plupart des bacilles sporulés, cette digestion se fait en milieu fortement acide.

Aérobio strict, le bacille M ne forme pas de voile et, par suite, pousse très mal dans les milieux liquides. Au contraire, dans les milieux solides, en surface, il donne des cultures extrêmement abondantes.

2^e LA TECHNIQUE BACTÉRIOLOGIQUE. — D'une manière générale, la technique employée dans ces recherches consiste à préparer, à l'état pur, des corps microbiens en quantités importantes et à en faire des dilutions dans de l'eau distillée stérile, sans contamination. Ces dilutions sont ensuite mises à l'étuve.

Pour la préparation des corps microbiens, j'ai employé les cultures en surface, sur milieux gélosés. J'ai utilisé des bouillons divers : ils doivent être riches en glucides et en azote soluble. Je signalerai les formules suivantes qui m'ont donné toute satisfaction.

Formule I.

Peptone Martin en centimètres cubes.	500
Saccharose en grammes.	20
Gélose en grammes.	25
Bouillon de haricots q. s. pour 1.000 centimètres cubes.	

Avec un peu de soude, on amène à la neutralité au tourne-sol.

Formule II.

Elle a été surtout utilisée dans le cas où de grandes quantités de milieu étaient nécessaires. 5 kilogrammes de malt en farine sont versés dans 19 à 20 litres d'eau à 45-48°. Cette température est maintenue une demi-heure, puis élevée progressivement, en trente minutes, à 70°. On la laisse alors stationnaire pendant une demi-heure. Durant toute l'opération, on brasse constamment. Après filtration, le moût est amené à 18 litres avec les eaux de lavage, ajusté à $P_{H} 7$, avec un peu de soude et en employant la phénolsulfonephthaléine comme indicateur. Un peu pauvre en azote soluble, il est additionné de 1 gr. 5 d'urée par litre. Ce milieu, gélosé à 2,5 à 3 p. 100, permet d'obtenir des cultures superbes, faciles à récolter.

L'eau de levure autolysée donne également de belles récoltes, mais dans ce milieu le bacille M devient visqueux et filant et est très difficile à recueillir.

Comme matériel, j'ai employé les boîtes de Roux, les boîtes de Nicolle et finalement de grandes boîtes de Pétri métalliques.

Les boîtes de Roux m'ont servi toutes les fois que je devais garder la culture microbienne plus de quarante-huit heures :

elles permettent d'éviter toute contamination. Pour les essais plus courts, les boîtes de Nicolle m'ont rendu de grands services et la technique de Nicolle et Allilaire [30] m'a permis d'obtenir facilement des quantités importantes de microbes. Par la suite, j'ai employé des boîtes de Pétri formées de deux couvercles en fer-blanc emboîtés l'un dans l'autre et ayant respectivement 20 et 22 centimètres de diamètre. Soixante de ces boîtes, remplies de moût de bière gélosé, donnent facilement une récolte de 1 kilogramme de bactilles frais, soit 230 grammes de bacilles secs.

A moins d'indications contraires, toutes les cultures ont été faites à 30°.

Avec les boîtes de Roux, la dilution dans l'eau distillée stérile est effectuée dans les boîtes mêmes. Avec les boîtes Nicolle et les boîtes de Pétri, j'ai utilisé la technique de Nicolle et Allilaire.

Dans tous les cas, sauf indication contraire, les dilutions microbiennes ont été mises en incubation à l'étuve à 30°.

Il est évident que toutes ces opérations successives : culture, récolte et émulsion dans l'eau, ont été faites avec toutes les précautions voulues pour éviter toute contamination. Elles relèvent de la technique bactériologique générale et je n'ai pas à y insister. Un contrôle régulier m'a permis de m'assurer du reste de la pureté bactériologique des cultures et des dilutions. Aussi, ai-je pu effectuer l'autolyse en milieu aqueux sans employer d'antiseptique.

Je tiens à insister sur une précaution essentielle.

Dans de très nombreux essais, j'ai eu à prélever, pour analyse ou pour expériences particulières, des portions aliquotes des émulsions microbiennes. Pour que les résultats obtenus aient une valeur quelconque, il importe que la dilution possède une homogénéité suffisante. Celle-ci est difficile à obtenir. J'indiquerai brièvement la technique que j'ai utilisée pour homogénéiser les émulsions de bacilles.

Les microbes sont recueillis dans un flacon vide, taré et à large ouverture (flacon Fourneau). Ils sont pesés et additionnés d'eau distillée dans laquelle ils sont délayés sommairement avec des baguettes de verre stériles. Une agitation énergique du flacon complète cette première homogénéisation tout à fait insuffisante. La masse microbienne, assez épaisse, est

aspirée dans un grand ballon contenant de l'eau et des perles de verre. Le tout naturellement est stérile. En remuant énergiquement, on arrive à obtenir une bonne dissociation des amas microbiens. La dilution est alors décantée par siphonage : les petits morceaux de gélose entraînés restent à la surface et les masses de bacilles non désagrégées dans le fond. Le liquide obtenu a un peu l'aspect de lait et son homogénéité est suffisante. Je citerai, entre autres, les deux essais suivants.

Premier essai.

Quatre prélèvements sont faits dans une même émulsion. On dose, dans chacun d'eux, l'extrait sec.

NUMÉRO	POIDS de la dilution en grammes	EXTRAIT sec p. 100
—	—	—
1	218,84	8,56
2	198,27	8,57
3	276,46	8,52
4	209,83	8,46
Moyenne	"	8,53
Ecart maximum.	"	0,44

Deuxième essai.

Premier prélèvement 10,114 p. 100 d'extrait sec
Deuxième prélèvement 10,150 p. 100 d'extrait sec

Ces chiffres montrent, qu'avec certaines précautions, l'homogénéité des émulsions microbiennes peut être suffisante.

II. — L'acidification autolytique.

Dans ce chapitre, j'étudierai l'augmentation de l'acidité qui se produit dans les macérations aqueuses du bacille M, placées à l'étuve.

Avant d'exposer les résultats obtenus, il convient d'indiquer les techniques employées pour la détermination de l'acidité et pour celle de l'extrait sec.

J'ai déterminé dans quelques cas la concentration en ions H. Pour cela, j'ai utilisé la méthode colorimétrique en me servant comme indicateurs du bleu de bromothymol, du pourpre de

bromocrésol, du rouge de méthyle et du bleu de bromophénol (produits RAL). Par suite de son opacité, on ne peut mesurer le P_H directement sur l'émulsion : on la centrifuge et l'examen est effectué avec le liquide transparent obtenu.

Mais dans ce travail, la concentration de l'émulsion microbienne en groupes carboxyle est beaucoup plus intéressante à considérer que sa richesse en ions H. Aussi j'ai surtout suivi les variations de l'acidité totale, titrable à froid, directement, avec de la soude N/10, en présence de phénolphthaleïne comme indicateur. Le virage est très net. En titrant à chaud ou par retour, on toucherait à des corps neutres, saponifiables, et les résultats obtenus auraient une tout autre signification.

Quant à l'extrait sec il convient de le définir exactement, car, suivant la méthode employée, on peut obtenir des résultats très différents. Les bacilles sont préparés suivant la méthode de Nicolle et Allilaire, récoltés à sec, émulsionnés dans l'eau distillée qui n'a pas été en contact avec la gélose. La dilution obtenue est homogénéisée et une partie aliquote est évaporée au bain-marie, puis desséchée dans le vide et pesée. On obtient ainsi l'extrait sec.

RÉACTION INITIALE. — Cultivé en milieu complet, renfermant des glucides ou des produits ternaires assimilables, le bacille M a une réaction acide.

Avec une culture de deux jours, on obtient une émulsion à 2 p. 100 d'extrait sec dont le P_H a une valeur de 5,5 à 5,4.

Quant à l'acidité totale, le tableau suivant donne un certain nombre de résultats.

*Acidité totale initiale
exprimée en centimètres cubes de solution N/10.*

NUMÉRO de l'essai	ACIDITÉ en cent. cubes N/10	EXTRAIT sec en grammes	ACIDITÉ pour 1 gramme d'extrait sec en cent. cubes N/10
88-P-I.	57,6	20	2,88
146-P-II	34	13,5	2,52
153-P.	111	31,53	3,52
48-L-I.	568	234	2,43
178-P.	112	36	3,10

L'acidité varie un peu pour un même poids de microbes secs. Ces variations tiennent à la composition initiale du milieu, à l'âge de la culture et, surtout, étant donné la vitesse d'acidification, à la durée des opérations de récolte et d'homogénéisation, et à la température à laquelle celles-ci sont effectuées.

Lorsque le milieu ne renferme plus d'éléments ternaires assimilables et que, par suite, le bacille M doit dégrader des protides, la réaction devient alcaline par la formation d'ammoniaque :

Pour 300 cent. cubes de dilution microbienne.

	ACIDITÉ en cent. cubes de solution N/10	ALCALINITÉ en cent. cubes de solution N/10
Culture de deux jours	21	»
Culture de cinq jours.	22,8	»
Culture de neuf jours	»	29,7

C'est là un phénomène d'ordre général.

ACIDIFICATION. — Quand, opérant comme je l'ai indiqué, on met une macération aqueuse du bacille M à l'étuve, on constate qu'elle s'acidifie immédiatement, avec une rapidité explosive suivant l'expression de Sevringshaus au sujet de l'acidification autolytique du foie.

La valeur de P_H , qui était de 5,5 à 5,4 au début, tombe à 4,7 au bout de quarante-huit heures et après huit jours est aux environs de 4,3 à 4,4. Cette dernière détermination est d'ailleurs difficile et peu précise.

L'acidité totale, titrable à la soude décinormale, augmente rapidement. Le tableau suivant donne les variations de l'acidité totale pendant les premières heures. J'appelle « acidification » le rapport de l'acidité observée à l'acidité initiale.

	ACIDITÉ TOTALE en cent. cubes N/10	ACIDIFICATION
Au début.	37,5	1
Après quatre heures	66,0	1,76
Après sept heures.	81,0	2,16
Après vingt-quatre heures.	144,0	3,83

L'acidité continue à augmenter pendant quatre à cinq jours.

puis reste stationnaire et a, ensuite, une légère tendance à diminuer. Des nombreux essais effectués à ce sujet, je ne signalerai que le suivant.

	ACIDITÉ TOTALE en cent. cubes N/10	ACIDIFICATION
Au début	20,77	—
Après un jour	51,59	2,48
Après deux jours	70,00	3,40
Après trois jours	81,93	3,94
Après cinq jours	94,79	4,55
Après six jours	95,78	4,61
Après huit jours.	96,35	4,65

Essai L-46 : Volume de la dilution 100 cent. cubes.

La courbe I traduit graphiquement ces résultats.

INFLUENCE DE L'ÂGE DES CULTURES. — Pour étudier cette question, 100 boîtes de Roux ont été ensemencées. Après deux jours de culture, 20 servent à faire une première émulsion dans 300 cent. cubes d'eau distillée. On recueille, sur chaque boîte, la totalité de la culture microbienne. Après cinq jours, 20 autres boîtes sont récoltées de même et 20 dernières sont employées après culture de neuf jours. 60 boîtes sur 100 sont seulement utilisées. Cette sélection permet de choisir des cultures bien homogènes et autorise la comparaison des résultats obtenus avec les trois dilutions.

Ces émulsions sont mises à l'étuve et on y suit les variations de l'acidité totale.

Le tableau suivant donne les résultats. L'acidité et l'alcalinité sont exprimées en centimètres cubes de solution N/10. Le signe + exprime l'acidité, le signe — l'alcalinité.

Essai P-130 : Volume de chaque émulsion : 300 cent. cubes.

	AGE DE LA CULTURE		
	Deux jours	Cinq jours	Neuf jours
Extrait sec en grammes.	6,3	7,16	2,45
<i>Acidité ou alcalinité en centimètres cubes N/10 après macération de :</i>			
Au début.	+ 21	+ 22,5	- 29,7
Un jour	+ 94,4	+ 132	"
Trois jours.	+ 126	+ 141	+ 12
Quatre jours.	+ 136,5	+ 151,5	+ 13,5
<i>Acidité formée pour 1 gramme de microbes secs :</i>			
Centimètres cubes N/10 .	18,3	18,0	17,6

La courbe II exprime graphiquement les mêmes résultats.

L'acidité formée pour 1 gramme de microbes secs est la même dans les trois cas et cependant, avec les bacilles âgés de neuf jours, l'émulsion initiale était franchement alcaline. Ce fait indique que, dans les limites de l'expérience, l'âge des cultures n'a pas d'influence sur l'acidification.

ACTION DE LA TEMPÉRATURE. — La température a une influence très marquée. Je citerai entre autres l'essai suivant. Une émulsion bactérienne dans l'eau distillée est répartie par portions égales en quatre flacons stériles qui sont placés à des températures différentes.

	TEMPÉRATURE			
	5°	30°	48°	100° puis 30°
Au début	2,5	—	2,5	—
Après dix-huit heures	2	8	7	2
Après quarante-huit heures .	2,5	11,0	9,0	2,5
Acidification finale.	1	4,4	3,6	1

Il suffit de porter l'émulsion à 100° pour empêcher toute acidification ultérieure. L'optimum de température est compris entre 30 et 35°.

Ces faits prouvent nettement que cette acidification n'est pas seulement due à un phénomène physique de diffusion d'un acide préformé et libre dans la cellule, mais est provoquée au contraire par un processus biologique, évidemment diastasique.

ACTION DE L'OXYGÈNE. — Les phénomènes d'acidification sont souvent provoqués par oxydation. Il était intéressant de rechercher dans le cas présent s'il en était ainsi ou si, au contraire, les émulsions aqueuses du bacille M mises dans le vide à l'abri de l'oxygène étaient encore capables de s'acidifier. J'ai fait à ce sujet plusieurs essais qui, tous, ont donné des résultats analogues. J'en citerai deux.

Essai 146 : Une dilution microbienne provenant de 50 boîtes de Roux est, après homogénéisation, divisée en deux portions égales de chacune 294 cent. cubes. La portion A est mise dans un flacon Fourneau au large contact de l'air, tandis que la portion B est placée dans un ballon, muni d'un tube manomé-

trique et dans lequel on fait le vide. Les résultats obtenus après trois jours sont réunis dans le tableau suivant :

	FLACON A à l'air	FLACON B dans le vide
Poids sec des microbes	—	—
Acidité au début en centimètres cubes N/10, A1.	34	34
Acidité à la fin en centimètres cubes N/10, A2.	257	232,5
A2/A1	7,56	6,85
A2-A1 pour 1 gramme de microbes secs	16,44	14,64

Malgré l'absence d'oxygène, il y a eu acidification intense. D'autre part, le tube manométrique a permis de constater qu'il n'y a pas eu de dégagement de gaz; il n'y a pas de perte d'azote, ni formation sensible d'acide carbonique. Ce fait a été vérifié à plusieurs reprises.

Dans cet essai, qui n'a duré que trois jours, l'acidification dans le vide a été un peu moindre que celle qui s'est manifestée au contact de l'air.

Dans l'expérience suivante, dans laquelle la macération a été maintenue dix-sept jours à l'étuve, c'est le contraire qui s'est produit.

Essai 88 P :

	FLACON A à l'air	FLACON B dans le vide
Volume en centimètres cubes	—	—
Poids sec en grammes	576	576
A1 en centimètres cubes	10	10
A2 en centimètres cubes	28,8	28,8
A2/A1	164	198,7
A2-A1 pour 1 gramme de microbes secs en centimè- tres cubes N/10	5,7	6,9
	13,5	17,0

Ces essais indiquent que l'acidification des dilutions aqueuses du bacille M n'est pas due à la formation d'une fonction acide par un processus d'oxydation, mais constitue un phénomène essentiellement anaérobiose : dédoublement comme dans le cas de la fermentation lactique, ou saponification comme dans le cas de la décomposition des éthers-sels.

INFLUENCE DE LA DILUTION. — Dans l'essai suivant, j'ai recherché si l'acidification finale était fonction de la concentration.

Essai 88 :

	I	II
Volume de la dilution en centimètres cubes	576	576
Poids de microbes secs en grammes	19,994	9,997
Acidité initiale A1 en centimètres cubes N/10. . .	57,6	28,8
Acidité finale A2 en centimètres cubes N/10 . . .	324,3	164,15
A2/A1.	5,7	5,7
Acide formé pour 1 gramme microbes secs . . .	13,53	13,53

Cette expérience prouve que, dans les limites de concentrations observées, l'acidification est fonction du poids sec des microbes mis en œuvre et non de leur plus ou moins grand degré de dilution.

CARACTÈRE AUTOLYTIQUE DE L'ACIDIFICATION. — Les essais effectués sur l'action de la température ont démontré que l'acidification des émulsions aqueuses du bacille M est un phénomène biologique, résultant de la formation d'acides libres et non de leur simple diffusion. Il est intéressant de rechercher si les substances mères des acides formés sont des produits solubles dérivant du milieu de culture primitif ou, au contraire, des composés insolubles ou difficilement diffusibles, faisant partie du contenu cellulaire; en d'autres termes, si cette acidification est un phénomène d'autolyse.

Dans la première hypothèse, les bacilles dilués dans l'eau distillée, puis séparés des substances solubles par centrifugation et enfin remis en suspension dans l'eau distillée, ne doivent plus s'acidifier ou tout au moins ne doivent s'acidifier que très peu. Dans la seconde hypothèse, si le phénomène est autolytique, il ne doit pas être modifié par ce traitement ou, s'il y a une différence, elle doit être très faible.

Je signalerai un des essais effectués sur ce sujet. Tous ont donné des résultats analogues.

Essai P-166 : On fait une dilution avec des bacilles préparés suivant la technique de Nicolle et Allilaire. Dans ces conditions, les substances solubles originaires du milieu de culture sont peu importantes. Une partie de cette dilution est centrifugée en prenant toutes les précautions voulues pour éviter une contamination. Le liquide clair L, qui contient encore des corps microbien, est séparé à l'aide d'une boule stérile de la masse microbienne M, qui ne contient plus que très peu de

liquide d'interposition et qui, à nouveau, est diluée dans de l'eau distillée stérile. Une autre partie de la dilution n'est pas centrifugée et sert de témoin. Les analyses finales sont faites après trois jours d'incubation à 30°. Par calcul, les deux portions I (centrifugée) et II (non centrifugée) sont ramenées à un même poids initial :

	I (CENTRIFUGÉ)			II témoin
	L	M	M + L	
<i>Au début :</i>				
Poids de la dilution en grammes	47,511	17,609	65,229	65,229
Acidité en centimètres cubes N/10	2,36	2,90	5,25	5,25
Extrait sec en grammes	0,244	1,331	1,575	1,575
Acidité pour 1 gramme extrait sec en centimètres cubes N/10 (A1)	9,63	2,48	3,33	3,33
<i>Après macération de trois jours à 30°.</i>				
Acidité en centimètres cubes N/10	4,27	18	22,27	23,5
Acidification	4,81	6,21	4,25	4,47
Acidité pour 1 gramme de l'extrait sec (A2) en centimètres cubes N/10	17,45	13,51	14,45	14,90
A2-A1.	7,82	11,33	10,82	11,57

La portion liquide L, qui contenait encore quelques corps microbiens, s'est acidifiée, mais très peu, alors que la portion M, riche en bacilles mais très pauvre en éléments solubles originaire du milieu de culture, s'est acidifiée à peu près normalement. En fait, en faisant la somme M + L, on constate que la centrifugation a eu pour résultat de diminuer un peu l'acidité formée pour 1 gramme de matière sèche : 10,82 au lieu de 11,57, soit une différence de 0,75.

Ces résultats ne peuvent s'expliquer qu'en admettant que les substances mères des acides sont intracellulaires.

On pourrait objecter que, malgré la centrifugation, des substances solubles sont restées dans la masse M en quantités suffisantes. Il est facile de prouver qu'il n'en est pas ainsi. On ne peut déterminer leur poids avec exactitude, mais on peut fixer une valeur qui lui est sûrement supérieure. Admettons que le liquide resté dans M ait justement le poids de M, soit 17,609 grammes et la composition de L. L'extrait sec soluble resté dans la portion M sera, par suite, sûrement inférieur à :

$$\frac{0,244 \times 17,609}{47,511} \text{ soit } 0 \text{ gr. 090.}$$

Or, l'acidité formée dans la masse M est de 15 c. c. 1 de solution N/10.

Je démontrerai qu'environ les trois quarts de cette acidité sont dus à l'acide β -oxybutyrique : il y a donc eu formation d'environ 117 milligrammes de cet acide, qui ne peuvent dériver des 90 milligrammes de substances dissoutes.

Les acides formés dans les émulsions aqueuses du bacille M ne peuvent provenir que de substances intracellulaires et le phénomène d'acidification est un phénomène d'autolyse.

GRANDEUR DU PHÉNOMÈNE. — L'acidification, c'est-à-dire le rapport de l'acidité finale à l'acidité initiale, atteint le plus fréquemment 6,5 à 6,9. Le maximum observé a été de 7,56. Quant au minimum, il est difficile à déterminer, car, par suite de la rapidité d'acidification, le chiffre pris pour l'acidité initiale est souvent trop fort.

L'acidité formée par gramme de microbes secs varie quelque peu suivant les conditions culturales : le plus souvent elle est de 15 à 18 cent. cubes de solution N/10. Le maximum observé est de 18 c. c. 33. Quant au minimum, il y a les mêmes difficultés de détermination que pour le minimum d'acidification.

Il est intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus par Sevringshaus avec de la pulpe de foie.

100 grammes de pulpe de foie, qui avaient une acidité totale de 24 cent. cubes de solution 0,2 N, offrent, après quarante-huit heures, une acidité de 67 c. c. 8. L'acidification est de 2,82. Avec le bacille M, je trouve au bout du même temps des chiffres du même ordre de grandeur.

CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE.

1^o Les émulsions aqueuses du bacille M s'acidifient rapidement.

L'acidité finale atteint six à sept fois l'acidité initiale. L'acidité formée pour 1 gramme de microbes secs correspond au maximum à 16 à 18 cent. cubes de solution N/10.

2^o Ce phénomène n'est pas un simple phénomène physique de diffusion : il est d'ordre biologique, sans doute diastasique.

3° Cette acidification se produit également en l'absence d'oxygène.

4° Elle se fait aux dépens de substances intracellulaires, c'est-à-dire fait partie des processus biochimiques qui constituent l'autolyse.

III. — Les acides formés. L'acide β -oxybutyrique.

Ayant étudié l'acidification produite par l'autolyse du bacille M, il importait de déterminer la nature chimique des acides formés.

ACIDES VOLATILS.

La quantité totale d'acides volatils est extrêmement faible.

Essai L-87 : 614 grammes de microbes frais sont émulsionnés dans de l'eau distillée. La dilution totale pèse 1.457 grammes. Après trois jours de macération, l'acidité finale est de 1.375 cent. cubes N/10. La totalité de cette dilution est placée dans un ballon de 3 litres maintenu dans un bain-marie d'eau salée chauffé à l'ébullition. Par une tubulure, on fait passer dans l'émulsion microbienne un courant de vapeur d'eau. Un réfrigérant condense les vapeurs. On recueille ainsi 900 cent. cubes de distillat, qui contient une substance insoluble, à réaction acide. Le distillat même est un peu acide. On le filtre sur un filtre taré. On recueille 0,022 grammes d'acide insoluble dont le point de fusion est de 24°. Je n'ai pu le purifier, en ayant une trop petite quantité. Comme acide simple, ayant l'indice d'acide le plus élevé, il y a l'acide caprique, 22 milligrammes de cet acide correspondent à 1 c. c. 5 de solution N/10, soit 0,11 p. 100 de l'acidité totale.

Quant à l'acidité volatile soluble, elle est de 27 cent. cubes de solution N/10, soit de 1,96 p. 100 de l'acidité totale.

Je n'ai pu caractériser les acides volatils formés par suite de leur peu d'importance.

En résumé, 0,11 + 1,96, soit 2,07 p. 100 de l'acidité totale sont dus aux acides volatils. 97,93 p. 100, soit la presque totalité, reviennent aux acides fixes.

ACIDES FIXES.

Les réactions des acides lactique, succinique et oxalique donnent des résultats nuls ou douteux. La présence constante de l'acétone dans les cultures du bacille M et dans ses dilutions aqueuses m'a conduit à rechercher et à trouver l'acide β -oxybutyrique.

Je vais indiquer les procédés que j'ai employés pour le préparer, le caractériser et le doser.

PRÉPARATION DE L'ACIDE β -OXYBUTYRIQUE. — La première méthode que j'ai employée consiste à effectuer une série de précipitations par l'alcool. Après distillation de l'alcool, concentration du résidu au bain-marie, on obtient un sirop fortement coloré dans lequel on peut caractériser l'acide qui reste cependant fort impur.

Par la suite j'ai complètement abandonné cette méthode et lui ai substitué la technique classique de l'extraction par l'éther.

La macération microbienne est précipitée par 4 volumes d'alcool à 95°-96°. Après agitation et repos, on décante le liquide clair sur un grand filtre à plis dans lequel on jette, à la fin, la totalité de la masse microbienne. La filtration est lente, mais s'effectue facilement en une nuit. Le filtrat, parfaitement limpide, est distillé et concentré au bain-marie de façon à éliminer les dernières traces d'alcool. Le résidu aqueux est séparé d'un précipité floconneux par filtration sur un petit filtre plat. Le filtrat est concentré au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse et mélangé à du plâtre sec. La poudre ainsi obtenue est desséchée dans le vide, puis, après pulvérisation, épuisée par l'éther dans un appareil Soxhlet. Dans ces conditions, l'épuisement se fait bien, mais le résidu insoluble reste toujours acide quel que soit le temps de l'extraction. Il y a un produit acide soluble dans l'eau, mais insoluble dans l'éther.

La solution éthérée est distillée : le résidu repris par l'eau donne une solution peu colorée, un peu louche et qui, après deux ou trois filtrations sur un même filtre, devient limpide. C'est cette solution ainsi préparée qui me sert à caractériser l'acide β -oxybutyrique.

CARACTÉRISATION DE L'ACIDE β -OXYBUTYRIQUE. — Contrairement à celle des urines, la composition du liquide d'autolyse du bacille M est tout à fait inconnue. Aussi, pour affirmer que l'acide β -oxybutyrique en fait partie, je devais avoir un ensemble de réactions nettes et positives. J'ai eu recours aux caractères suivants :

1^o Détermination du pouvoir rotatoire spécifique;

2^o Comparaison, pour un même poids de substance active, des déviations polarimétriques en milieu acide et en milieu alcalin;

3^o Formation d'acétone par oxydation sulfochromique;

4^o Formation d'acide α -crotonique par déshydratation;

1^o *Détermination du pouvoir rotatoire spécifique.* — L'acide que j'ai isolé est lévogyre, comme l'acide β -oxybutyrique trouvé dans l'organisme des animaux supérieurs.

Le pouvoir rotatoire spécifique de cet acide est, d'après Magnus Lévy, de $-24,42^\circ$ à $17,22^\circ$ pour une concentration de 12 p. 100 [31]. Black, qui opère à des concentrations de 1,5 à 3,2 p. 100, adopte pour α -D la valeur moyenne de 22° à 32° . Guiard et Grimbert dans leur traité d'analyse donnent pour ce même pouvoir rotatoire $21,42^\circ$.

Si je trouve, pour l'acide que j'ai isolé, un pouvoir rotatoire voisin de celui de l'acide β -oxybutyrique, j'aurai une caractérisation de grande valeur.

Pour appliquer la formule

$$[\alpha] = \frac{\gamma \times 100}{c \times l}$$

il me faut déterminer la concentration c . J'admet, par hypothèse, que toute l'acidité du liquide est due à l'acide β -oxybutyrique que je titre directement à la soude N/10 en présence de phtaléine. Je trouve pour c et, par suite pour α -D des résultats qui sont consignés aux colonnes III et V du tableau. On constate que les valeurs obtenues pour le pouvoir rotatoire spécifique de l'acide sont assez variables et, en tout cas, très différentes de celle qu'aurait dû donner l'acide β -oxybutyrique. Mais si, au lieu de faire un titrage direct, j'effectue une saponification à chaud avec un excès de soude que je titre finalement par retour avec de l'acide sulfurique N/10, j'obtiens

pour c des valeurs nouvelles, plus grandes (colonne IV) qui conduisent pour α -D à des chiffres variant très peu et qui sont très voisins de ceux admis pour le pouvoir rotatoire spécifique de l'acide β -oxybutyrique (colonne VI).

NOMBRE de l'essai	c OBTENU PAR TITRAGE			CALCULÉ D'APRÈS	
	déviation observée en degrés	direct	après saponification	c de III en degrés	c de IV en degrés
		I	II	III	IV
L-74 . . .	— 1,21	0,861	1,159	— 28,3	— 21
L-32 . . .	— 2	3,33	4,78	— 30	— 21
L-73 . . .	— 8,35	15,70	19,81	— 26,34	— 21,07
L-74 . . .	— 4,26	5,116	6,636	— 27,79	— 21,36
P-160 . . .	— 2,82	4,98	6,32	— 28,2	— 22,2
P-161 . . .	— 2,83	4,89	6,37	— 29	— 22,2
P-198 . . .	— 3,75	5,93	8,10	— 31,5	— 23,2
P-175 . . .	— 3,83	"	8,53	— 29,8	— 22,6

Ces résultats, qui dans les nombreux essais effectués n'ont jamais été contredits, prouvent :

1^o Que l'acide préparé, comme je l'ai indiqué en partant des émulsions du bacille M, est bien l'acide β -oxybutyrique;

2^o Qu'il existe à un état relativement pur et n'est pas accompagné de quantités appréciables d'un autre acide fixe soluble dans l'éther;

3^o Qu'en solution aqueuse, il est partiellement éthérifié, sans doute sous forme d'un éther interne.

2^o *Comparaison, pour un même poids de substance active, des déviations polarimétriques en milieu acide et en milieu alcalin.* — J'admet, par hypothèse, que la solution à essayer ne contient comme substance active que l'acide β -oxybutyrique. J'examine la déviation qu'elle exerce sur la lumière polarisée, le milieu contenant un excès d'acide sulfurique et, par suite, tous les acides organiques étant à l'état libre. J'en déduis c .

J'alcalinise la solution avec un excès de soude et je l'amène à un volume déterminé. Tous les acides sont à l'état de sels de sodium. Connaissant c , concentration initiale en acide β -oxybutyrique, il est facile de calculer c' , concentration de la solution alcaline en β -oxybutyrate de sodium.

D'après Magnus Lévy, le pouvoir rotatoire spécifique de ce sel est de $-14,35^\circ$. Il est donc facile de déterminer, par calcul, la déviation que doit donner la solution alcaline et une lecture directe au polarimètre permettra de reconnaître si l'hypothèse initiale est justifiée.

Les résultats obtenus par cette méthode sont réunis dans le tableau suivant.

DÉVIATION POLARIMÉTRIQUE		DIFFÉRENCE
calculée	observée	
—	—	—
$-1^{\circ}30'$	$-1^{\circ}26'$	$4'$
$-0^{\circ}40'$	$-0^{\circ}38'$	$2'$
$-1^{\circ}13'$	$-1^{\circ}11'$	$2'$

La concordance est très bonne et l'hypothèse initiale est vérifiée. Il convient de remarquer que cette méthode est bien caractéristique : dans les calculs interviennent les pouvoirs rotatoires spécifiques de l'acide et de son sel de sodium et l'indice de soude de l'acide. Une petite quantité d'une autre substance active amènerait de grandes différences entre les chiffres calculés et ceux obtenus directement. Cette méthode peut être utilisée en présence d'autres acides inactifs.

3^e *Formation d'acétone par oxydation sulfochromique.* — L'acide β -oxybutyrique traité par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique s'oxyde et se décompose en donnant de l'acide carbonique et de l'acétone [34].

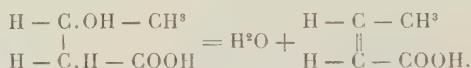
Cette réaction n'est pas quantitative et ne peut être considérée comme spécifique. Insuffisante par elle-même pour caractériser l'acide β -oxybutyrique, elle est nécessairement positive quand on opère avec cet acide. Aussi, l'ai-je effectuée à de nombreuses reprises.

Le sirop acide, préparé comme je l'ai indiqué, est traité par le mélange chromique et distillé. Le distillat neutralisé avec un peu de soude est rectifié et les portions les plus volatiles sont riches en acétone.

Ce produit a été caractérisé lui-même par les réactions générales : réaction de Lieben (formation d'iodoforme), celle de Legal au nitro-prussiate, celle de Denigès (précipitation par le sulfate mercurique), celle de Frommer, etc. Mais je me

suis basé surtout sur la réaction spécifique de l'orthonitrobenzaldéhyde qui m'a permis d'obtenir facilement l'indigo.

4^o *Formation d'acide α -crotonique par déshydratation.* — Par déshydratation, les α -oxyacides donnent facilement les acides éthyléniques correspondants et, en particulier, l'acide β -oxybutyrique fournit, dans ces conditions, l'acide α -crotonique, corps cristallisé dont la caractérisation est aisée.



On peut effectuer cette réaction suivant deux techniques. La plus simple et la plus rapide consiste à distiller directement en présence d'un peu d'acide sulfurique le sirop dans lequel on soupçonne la présence d'acide β -oxybutyrique. J'ai assez souvent opéré de la sorte et j'ai toujours constaté, après distillation de l'eau, le passage d'un liquide épais qui se prend par refroidissement en une masse cristalline. Cette méthode est rapide, mais ne se prête pas par suite de son rendement déplorable à la caractérisation de petites quantités d'acide β -oxybutyrique.

Le second procédé, plus long, est beaucoup plus sensible. Il consiste à déshydrater l'acide en présence d'un grand excès d'acide sulfurique à 50 p. 100 en maintenant par addition d'eau le volume du liquide constant. Je citerai un exemple. 51 cent. cubes d'un sirop acide sont mis dans un ballon de 500 cent. cubes avec 74 cent. cubes d'eau et 125 cent. cubes d'acide sulfurique à 66° B.

On distille en ajoutant goutte à goutte de l'eau distillée pour garder le même volume. On a recueilli, au bout de trois heures, environ 500 cent. cubes de distillat fortement acide. Ce distillat est alcalinisé par de la chaux en excès, concentré au bain-marie et le résidu formé de carbonate et de sels organiques de calcium est décomposé par un peu d'acide sulfurique à 50 p. 100. La masse fluide obtenue est épuisée par l'éther sulfurique qui, évaporé à la température du laboratoire, donne une masse très pure de cristaux d'acide α -crotonique. On recueille ainsi du premier jet 2 grammes de cristaux.

Cette technique permet de retrouver de très faibles quantités d'acide β -oxybutyrique. Chaque fois que j'ai fait cette réaction

avec le sirop acide isolé des corps microbiens du bacille M, j'ai obtenu un résultat positif. Ce fait prouve bien que le premier acide est de l'acide β -oxybutyrique.

Mais l'obtention de cristaux ne suffit pas à caractériser l'acide α -crotonique. Pour y parvenir, j'ai utilisé les propriétés suivantes :

- 1^o Caractères extérieurs de l'acide obtenu ;
- 2^o Point de fusion ;
- 3^o Indice d'acide.

1^o CARACTÈRES EXTÉRIEURS. — J'ai comparé l'acide obtenu en partant des macérations aqueuses du bacille M à l'acide α -crotonique Poulenc. Ce dernier a été purifié par cristallisations successives dans l'eau, puis finalement dans l'éther anhydre. Les caractères extérieurs des deux acides sont absolument identiques : Cristaux en feuillets très minces, soyeux, solubles dans l'eau et très facilement dans l'alcool et l'éther. L'odeur est très désagréable et entêtante. Elle rappelle un peu celle de l'acide butyrique normal dilué, ce qui pourrait faire confondre ces deux acides dans un essai sommaire.

2^o POINT DE FUSION. — Essoré et bien sec, l'acide que j'ai isolé fond à 72^o comme l'acide α -crotonique.

3^o INDICE D'ACIDE. — Des cristaux préparés par déshydration du sirop acide issu des bacilles M sont essorés, pesés, mis en solution dans de l'eau distillée neutre et saturés par de la soude N/10 en présence de phénolphthaleine. J'indiquerai deux essais effectués, l'un avec des cristaux simplement essorés, le second avec un acide purifié par cristallisation dans l'éther.

	POIDS de matière employée en grammes	POIDS CALCULÉ d'après le titrage pour C ₄ H ₆ O ₂ en grammes	DIFFÉRENCES en grammes
I (176)	0,2062	0,2038	- 0,0024
II (96)	0,3432	0,3440	+ 0,0008

Ces résultats confirment les conclusions précédentes concernant la présence d'acide β -oxybutyrique dans les dilutions aqueuses du bacille M après autolyse.

DOSAGE DE L'ACIDE β -OXYBUTYRIQUE. — Les méthodes de dosage de l'acide β -oxybutyrique instituées en physiologie pour l'étude du sang et surtout de l'urine sont nombreuses. Elles se classent en trois catégories.

Dans une de ces catégories sont les techniques qui utilisent la formation d'acide α -crotonique.

Dans le cas actuel, elles sont intéressantes parce que chaque dosage constitue un essai de caractérisation. On est sûr que ce que l'on dose est bien réellement de l'acide β -oxybutyrique. Malheureusement, si ces méthodes sont spécifiques, elles ne sont pas précises, malgré les améliorations apportées par Pribram 1911-12 [35] aux techniques primitives de Stadelmann [36] et de Darmstaedter [37]. Aussi ne les ai-je pas employées.

Dans une autre catégorie sont les méthodes nouvelles qui utilisent l'oxydation de l'acide β -oxybutyrique en acétone par le mélange chromique.

Schaffer [38], Schaffer et Marriott [39], puis Schaffer et Hubbard [40] distillent, concentrent l'acétone par rectification et le dosent par iodométrie.

Van Slyke [41] précipite l'acétone par le sulfate mercurique suivant une réaction bien connue de Denigès. Il pèse ou, après dissolution, titre le précipité.

Ces méthodes sont excellentes dans des liquides très étudiés, comme l'urine et même à la rigueur comme le sang. Elles sont complètement à rejeter dans des milieux organiques nouveaux, tels que celui que j'étudie. En effet, la formation de l'acétone par elle-même n'est pas spécifique de l'acide β -oxybutyrique. Enfin, et surtout, le dosage de l'acétone est effectué à l'aide de réactions d'ordre général, nullement spécifiques de l'acétone. Ces méthodes donnent des chiffres très constants, mais qui n'ont aucune signification certaine dans des cas nouveaux.

J'ai eu finalement recours à un troisième procédé, le plus anciennement employé : le dosage au polarimètre. En le combinant avec un titrage acidimétrique, on obtient un dosage et une caractérisation.

Kulz examinait directement l'urine au polarimètre, après fermentation pour détruire le glucose [42].

Wolpe épouse l'urine par l'éther : les résultats sont mauvais, car, en milieu liquide, l'épuisement se fait très mal [33].

Magnus-Lévy [31], Bergell [44], Geelmuyden, puis Black [32] mettent au point diverses méthodes toutes basées sur l'emploi de l'éther. Ohlsson [45] lui substitue l'accétate d'éthyle.

La technique que j'ai adoptée dérive des méthodes précédentes. La dilution microbienne, correspondant à environ 20 grammes de matière sèche, est traitée exactement comme je le l'ai indiqué au sujet de la préparation de l'acide β -oxybutyrique, mais en opérant avec grand soin, quantitativement et en épousant les corps microbiens à plusieurs reprises par l'alcool bouillant. La solution éthérée obtenue est distillée et le résidu est repris par l'eau et amené à 50 cent. cubes, puis examiné au polarimètre. Je prends pour valeur de α -D la valeur moyenne de — 22°. On obtient ainsi un résultat que je vérifie à chaque opération. Je titre par de la soude N/10, par retour après saponification. Avec le liquide obtenu avec le bacille M, j'ai toujours trouvé des chiffres concordant parfaitement avec ceux donnés par le polarimètre. Dans quelques cas spéciaux, le dosage acidimétrique donne un résultat trop fort, par suite de la présence dans le liquide d'autres acides inactifs. Dans ces conditions, j'ai utilisé, comme contrôle, suivant la technique que j'ai précédemment exposée, la comparaison des déviations obtenues en milieu acide et en milieu alcalin.

Tous les résultats que j'indiquerai comme se rapportant à l'acide β -oxybutyrique ont été contrôlés par l'une ou l'autre méthode.

NATURE DE L'ACIDITÉ INITIALE. — J'ai indiqué précédemment que le bacille M est normalement acide. J'ai recherché en quelle mesure l'acide β -oxybutyrique contribue à cette acidité.

150 grammes de bacilles frais, récoltés après quarante-huit heures de culture, suivant la technique de Nicolle et Allilaire, sont immédiatement mis dans l'alcool à 96°, pour éviter tout phénomène d'autolyse. Ces 150 grammes correspondent à 33 grammes de microbes secs et ont une acidité totale équivalente à 116 cent. cubes de solution N/10. J'ai pu en extraire l'acide β -oxybutyrique et l'y doser. J'ai trouvé 0 gr. 894 de cet acide correspondant à 86 cent. cubes de solution N/10, c'est-à-dire à 74 p. 100 de l'acidité primitive totale.

Ce fait prouve que l'acide β -oxybutyrique préexiste dans les

corps frais du bacille M avant autolyse et que cet acide produit environ les trois quarts de l'acidité totale.

NATURE DE L'ACIDITÉ APRÈS AUTOLYSE. — N'étudiant pas, dans ce mémoire, le mécanisme chimique de la formation de l'acide β -oxybutyrique, je ne signalerai pas tous les dosages que j'ai effectués, mais je donnerai quelques chiffres qui permettent de se rendre compte du rôle de cet acide dans le phénomène de l'acidification autolytique du bacille M.

	P-91	P-103	P-151
Acidité totale en centimètres cubes N/10	367,5	60	540
Acidité due à l'acide β -oxybutyrique en centimètres cubes N/10	246	47	385,5

Pour 100 de l'acidité totale due à :

Acide β -oxybutyrique p. 100	67	78,3	71,3
D'autres acides p. 100	33	21,7	28,6

La conclusion qui se dégage de ces chiffres est que les deux tiers ou les trois quarts de l'acidité totale du bacille autolysé sont dus à l'acide β -oxybutyrique. Ce résultat est de même ordre que celui obtenu avec le même microbe avant autolyse.

AUTRES ACIDES FORMÉS. — 25 à 33 p. 100 de l'acidité totale formée par autolyse sont provoqués par d'autres acides. Sauf en ce qui concerne l'acide phosphorique, je n'ai pu en définir encore la nature chimique. Il m'a, du moins, été possible de déterminer, en une certaine mesure, la manière dont ils se répartissent au cours des diverses opérations de l'analyse. Je donnerai à ce sujet quelques indications.

PHOSPHATES ACIDES. — Les corps microbiens, épuisés à fond par l'alcool bouillant, restent acides quels que soient la durée et le nombre des épuisements. Je citerai l'exemple suivant :

Une dilution aqueuse du bacille M, après autolyse de quarante-huit heures, présente une acidité totale correspondant à 540 cent. cubes de solution N/10.

Les corps microbiens sont épuisés à fond par l'alcool bouillant, desséchés et pesés. On en trouve 18 gr. 450. Ils sont délayés au mortier dans de l'eau distillée neutre et la nouvelle

dilution obtenue est titrée directement par la soude, sans filtration : il faut en tout 78 c. c. 5 de soude N/10 pour arriver à neutralité. L'acidité, insoluble dans l'alcool bouillant et restant localisée dans les corps microbiens, correspond à 14,5 p. 100 de l'acidité totale.

La filtration de cette dilution est très difficile, mais on peut y parvenir en la traitant par un peu d'acide gallique et d'acide chlorhydrique suivant la technique de Kossel [19]. La filtration se fait facilement et il est aisément de caractériser et de doser, dans le filtrat, l'acide phosphorique.

Dans l'exemple cité, j'ai trouvé 0 gr. 057 de P_2O_5 , correspondant à 16 c. c. 1 d'une solution N/10 de phosphate monométallique, soit 3 p. 100 de l'acidité totale.

L'élimination de phosphates minéraux au cours du processus d'autolyse, signalée tout d'abord par Kossel, semble être absolument générale et le bacille M, à ce point de vue, se comporte comme les autres organismes étudiés jusqu'à ce jour.

ACIDES DE NATURE CHIMIQUE INDETERMINÉE. — L'acidité des corps microbiens, après épuisement par l'alcool, est de 14,5 p. 100 de l'acidité totale. Celle qui tient aux phosphates acides est de 3 p. 100. 11,5 p. 100 de l'acidité totale se trouvent donc dans les bacilles épuisés sans que l'on puisse les attribuer à l'acide phosphorique. Si l'on filtre directement la dilution aqueuse des microbes, après extraction à l'alcool, on constate que le filtrat obtenu, qui passe très difficilement, est moins acide que la bouillie microbienne restée sur le filtre : 10 cent. cubes du filtrat sont saturés par 0 c. c. 4 de soude N/10 alors que, pour la même quantité de dilution restée sur le filtre, il en faut 2 c. c. 2. Ce fait indique que l'acide non encore déterminé, qui accompagne les phosphates acides, est un acide très peu diffusible.

D'autre part, j'ai indiqué, en décrivant la méthode de préparation de l'acide β -oxybutyrique, que le résidu plâtré que l'on épuise à l'éther reste toujours acide quelle que soit la durée de l'extraction. L'acidité accumulée dans ce résidu correspond à environ 3 p. 100 de l'acidité totale. Je n'ai pu déterminer encore la nature de l'acide qui est très soluble dans l'eau, assez peu dans l'alcool fort, et insoluble dans l'éther.

Je donnerai, en terminant, un tableau résumant les résultats obtenus au sujet de la répartition des divers acides.

Acidité totale	100
Acidité due à l'acide β -oxybutyrique	66 à 75
Acidité due aux phosphates monométalliques (au moins).	3
Acidité due à des acides indéterminés :	
Acide peu diffusible, accumulé dans les corps microbiens.	12
Acide soluble dans l'eau, insoluble dans l'éther.	3
Acides volatils	2

Conclusions.

1^o Les émulsions aqueuses du bacille M, bacille très fréquent dans les terres arables et voisin du *B. Megatherium*, s'acidifient rapidement. L'acidité finale atteint en trois ou quatre jours 6 à 7 fois l'acidité initiale. Cette acidification, qui résulte d'un phénomène d'autolyse, s'effectue en l'absence d'oxygène, sans dégagement gazeux.

2^o Les deux tiers ou les trois quarts de l'acidité ainsi formée sont dus à l'acide β -oxybutyrique dont la production par processus microbien ou autolytique n'avait pas encore été signalée.

3^o Comme dans tous les phénomènes d'autolyse, il y a élimination de phosphates solubles. Les phosphates monométalliques expliquent au moins 3 p. 100 de l'acidité totale formée.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- [1] LEMOIGNE. *C. R. Acad. des Sciences*, **176**, 1923, p. 1761; **178**, 1924, p. 253.
- [2] LEMOIGNE. *C. R. Acad. des Sciences*, **178**, 1924, p. 103.
- [3] A. RENSHAW et Th. FAIRBROTHER. *British med. Journ.*, 1922, p. 674.
- [5] BRISSEMORET et AMBARD. *C. R. Soc. biol.*, **2**, 1904, p. 457.
- [6] LAUNOY. *Bulletin I. P.*, **6**, 1908, p. 289.
- [7] NICOLLE. *Ces Annales*, **27**, 1913.
- [8] SCHWIENING. *Virchow's Archiv*, **136**, 1894, p. 444.
- [9] BIONDI. *Virchow's Archiv*, **144**, 1896, p. 373.
- [10] HEDIN et ROWLAND. *Z. f. physiol. Ch.*, **32**, 1901, p. 341-531.
- [11] BAER et LOEB. *Archiv f. exp. Path. u. Pharmak.*, **53**, fasc. 1, 1905.
- [12] SCHRYVER. *The Journ. of. Physiol.*, **32**, 1905, p. 159.
- [13] HEDIN. *Journ. Physiol.*, **30**, 1903-1904, p. 155.
- [14] DOCHEZ. *Journ. Exp. Med.*, **12**, 1910, p. 666.
- [15] MORSE. *Journ. biol. Ch.*, **30**, 1917, p. 197; **31**, 1917, p. 303.
- [16] DERNBY. *Journ. biol. Ch.*, **35**, 1918, p. 179-219.

- [17] BÉCHAMP. *C. R. Acad. des Sciences*, passim, de 1863 à 1874.
- [18] SCHUTZENBERGER. *C. R. Acad. des Sciences*, **78**, p. 493, 1874 ; *Bull. Soc. chim.*, **21**, p. 304, 1874.
- [19] KOSSEL. *Z. f. physiol. Ch.*, **7**, 1882-83, p. 7.
- [20] SALKOWSKI. *Z. f. physiol. Ch.*, **13**, 1889, p. 506.
- [21] JACOBY. *Z. f. Physiol. Ch.*, **30**, 1900, p. 149-174.
- [22] SCHENK. *Z. f. physiol. Ch.*, **43**, 1905, p. 406-409 ; *Wochens. f. Brauerei*, 1905, p. 221.
- [23] RETTGER. *Journ. of med. Research*, **13**, 1905, p. 791-92.
- [24] MOCHIZUKI et ARIMA. *Z. f. physiol. Ch.*, **49**, 1906, p. 108-112.
- [25] MAZÉ et PERRIER. *Ces Annales*, **18**, 1904, p. 553 ; **23**, 1 09, p. 830.
- [26] ALLILAIRE. *Ces Annales*, **27**, 1913, p. 418.
- [27] POZERSKI. *C. R. Soc. biol.*, **87**, 1922, p. 1157 ; **88**, 1923, p. 18 et 239 ; **89**, 1923, p. 27 et 1094.
- [28] MOLLIARD. *C. R. Acad. des Sciences*, **1**, 1922, p. 881.
- [29] SEVRINGHAUS [L], *Journ. biol. Ch.*, **57**, 1923, p. 163-181-191.
- [30] NICOLLE et ALLILAIRE. *Ces Annales*, **23**, 1909, p. 547.
- [31] MAGNUS LÉVY. *Archiv f. exp. Path. u. Pharm.*, **45**, 1904, p. 389.
- [32] BLACK. *Journ. biol. Ch.*, **5**, 1908-1909, p. 207.
- [33] WOLPE. *Archiv f. exp. Path. u. Pharm.*, **21**, 1886, p. 18.
- [34] MINKOWSKI. *Archiv f. exp. Path. u. Pharm.*, **18**, 1884, p. 35.
- [35] PRIBRAM. *Z. f. exp. Path. u. Ther.*, **10**, 1911-12, p. 279.
- [36] STADELMANN. *Archiv f. exp. Path. u. Pharm.*, **47**, 1883.
- [37] DARMSTAEDTER. *Z. f. physiol. Ch.*, **37**, 1903, p. 355.
- [38] SCHAFFER. *Journ. Biol. Ch.*, **5**, 1908-09, p. 214.
- [39] SCHAFFER et MARRIOTT. *Journ. Biol. Ch.*, **16**, 1913-14, p. 265.
- [40] SCHAFFER et HUBBARD. *Journ. Biol. Ch.*, **24**, 1916.
- [41] VAN SLYKE. *Journ. Biol. Ch.*, **32**, 1917, p. 455.
- [42] KULZ. *Archiv. biol.*, **20**, 1884, p. 165.
- [44] BERGELL. *Z. f. physiol. Ch.*, **33**, 1901, p. 340.
- [45] OHLSSON. *Bioch. Z.*, **72**, p. 232.

(Travail du laboratoire de fermentations
de l'Institut Pasteur de Lille.)

UNE RÉACTION DE FLOCULATION POUR LE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et L. GALLERAND.

I

Les travaux que Levaditi, Marie, Yamanouchi publièrent en 1907 ont modifié complètement notre conception du mécanisme intime de la séro-réaction de la syphilis par la méthode de Bordet-Wassermann. Ils établissaient que la valeur de l'antigène n'est pas en rapport avec la présence ou l'absence de Tréponèmes dans le foie utilisé pour sa préparation, à telle enseigne qu'on pouvait, sans changer le résultat, remplacer dans la réaction l'extrait de foie syphilitique par de l'extrait de foie normal.

Dès lors, il devenait bien évident que la réaction de Bordet-Wassermann ne pouvait plus s'expliquer par une réaction spécifique des antigènes et des anticorps, contrairement à ce qu'on avait admis. Et les auteurs attribuaient la réaction « à la présence dans le sérum et dans le liquide céphalo-rachidien de certains composés à l'état colloïdal qui, en présence des sels biliaires et des lipoïdes du foie (employé comme antigène), précipitent et déterminent la fixation du complément ». Idée féconde, car elle devait engager les chercheurs à étudier plus complètement les propriétés physico-chimiques des sérum syphilitiques et conduire à la découverte de méthodes simples mettant en évidence ces propriétés.

Les travaux de Levaditi et de ses collaborateurs furent, en effet, confirmés et complétés par les recherches de nombreux expérimentateurs. C'est ainsi que Porgès, Neubauer, Elias, Salmon mettent en évidence cette précipitation en substituant aux extraits d'organes une émulsion de lécithine. Le phénomène devient plus apparent et plus régulier si on emploie des émulsions dans l'eau physiologique d'extraits alcooliques d'organes additionnés de cholestérol, comme l'ont démontré

Sachs et Georgi. On voit alors apparaître dans les sérum siphilitiques des granules, des petits flocons, dont la présence trouble le liquide plus ou moins suivant leur grosseur et leur abondance. On dit que le sérum « flocule » et le phénomène a reçu le nom de « flocculation ».

Ainsi, il était bien établi qu'il se produit, au cours de la syphilis, une modification de l'état physico-chimique du sérum sanguin (et du liquide céphalo-rachidien) des malades. Cette modification peut être mise en évidence, car elle se traduit en particulier par le fait qu'un sérum syphilitique flocule avec facilité, et suivant un rythme spécial, lorsqu'il est mis en présence de certaines suspensions colloïdales. Plusieurs réactions ont été imaginées pour établir pratiquement une méthode de diagnostic de la syphilis basée sur ces constatations expérimentales. Mais, proposées depuis 1908, elles ont été peu employées, la réaction de Bordet-Wassermann restant plus en faveur. Pendant la guerre, le grand nombre de sérum siphilitiques à examiner, la pénurie d'animaux, la difficulté de conserver des hématies, le manque de matériel, ont obligé les travailleurs à chercher des procédés plus simples. On a alors repris les méthodes de flocculation, on les a essayées sur une grande échelle : on ainsi constaté leur valeur et on les a conservées en les perfectionnant. Les procédés de flocculation les plus employés aujourd'hui sont ceux de Sachs et Georgi, Vernes, Meinike, Dreyer et Ward ; ils se sont peu à peu substitués à tous les autres. Dans un article paru dans le *Journal médical français* (n° 8, août 1923), nous avons exposé en détails la technique de la réaction de Dreyer et Ward, telle que nous l'avions vu pratiquer à Oxford, et pour laquelle nous avions modifié seulement l'instrumentation.

Parmi ces méthodes de flocculation, certaines ne demandent que des moyens optiques rudimentaires (lecture à la loupe avec ou sans éclairage spécial), mais donnent des résultats d'une lecture ou d'une interprétation souvent fort difficile ; d'autres donnent des résultats précis, mais nécessitent une instrumentation délicate et coûteuse et, par suite, conviennent surtout aux grands laboratoires qui ont un nombre important de réactions à effectuer. Nous avons étudié une méthode qui donne par la flocculation des résultats, nets, faciles à interpréter, et

cela sans aucune instrumentation optique spéciale. Cette méthode convient donc particulièrement aux petits laboratoires qui ont peu de réactions à effectuer. L'introduction du sérum dans un mélange d'antigène de Bordet-Ruelens et de teinture de benjoin, suivant la technique que nous allons indiquer, nous a paru pouvoir répondre à ce desideratum (1).

II. — Technique.

A. — PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

1^o *Antigène de Bordet et Ruelens* : Nous en rappelons la préparation, car la technique actuellement employée (voir article de Renaux in *Journal médical français*, n° 8, août 1923) diffère un peu de la technique initiale :

Un cœur frais de veau, débarrassé de son tissu fibreux et de sa graisse, est haché assez grossièrement; on ajoute à 100 grammes de ce hachis 125 cent. cubes d'alcool à 94° afin de coaguler les albumines, car cet alcool, immédiatement dilué dans le suc du tissu, n'exerce aucune action extractive appréciable. Après deux ou trois jours de contact à 20°, on filtre sur papier et la viande coagulée est desséchée à 57° dans un cristallisoir puis additionnée de 200 cent. cubes d'acétone. Contact dix à douze jours à 20° dans un flacon soigneusement bouché, en agitant deux fois par jour. On élimine l'acétone par filtration sur papier et on la remplace par une nouvelle quantité d'acétone qu'on laisse en contact cinq à six jours et que l'on écarte ensuite également par filtration. Le hachis se dessèche rapidement, puis est additionné de 200 cent. cubes d'alcool à 94° qui, en dix ou douze jours, à la température de 20°, dissout les lipoïdes spécifiques que l'acétone a laissés intacts.

Une filtration sur papier donne alors l'antigène brut, liquide jaune d'or, parfaitement limpide à la température du laboratoire. Desséché à 37° dans un verre de montre pendant vingt-quatre heures, il laisse 8 à 10 milligrammes de résidu par centimètre cube. Maintenu en flacon brun à la température du laboratoire, il se conserve pendant plusieurs mois.

(1) Voir *C. R. de la Société de Biologie*, 15 décembre 1923 et 12 janvier 1924.

2^o *Teinture de benjoin* : 1 gramme de résin^e de *benjoin de Sumatra* finement pulvérisée est mis en contact avec 10 cent. cubes d'alcool *absolu*; on laisse macérer pendant quarante-huit heures; *on filtre sur papier* (filtrer et non décanter) pour avoir une liqueur absolument limpide.

B. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

1^o Dans un tube à essai *parfaitement propre et sec* on mélange en proportions convenables l'antigène de Bordet-Ruelens, et la teinture de benjoin (par exemple 1 de benjoin et 5 de Bordet). On agite; le mélange est très homogène. Appelons-le *mélange initial*.

2^o Dans un tube à essai (de 22 ou au moins de 16) *parfaitement propre*, on verse 5 cent. cubes d'eau physiologique à 8,5 p. 1.000, *puis* (et non avant) 1/10 de cent. cube du mélange initial; on agite; la suspension doit être homogène. On ajoute alors 1 cent. cube du sérum à expertiser qui a été préalablement chauffé à 55° pendant trente minutes. On mélange soigneusement (par agitation et sans retourner le tube). On lit les résultats après cinq heures d'étuve à 37°. La flocculation est très apparente, *visible facilement* sans l'aide d'aucun appareil d'optique. Une autre émulsion faite dans les mêmes conditions, mais avec un sérum non syphilitique, sert de témoin.

C. — REMARQUES.

1^o a) Il faut employer du *benjoin de Sumatra* à l'exclusion de tout autre. Quatre expérimentateurs, opérant à l'insu les uns des autres, mais avec une même et mauvaise origine de benjoin, ont vu cesser brusquement de fournir des résultats une réaction qui jusque-là leur donnait toute satisfaction. Du reste, ce même benjoin n'était pas davantage utilisable pour la réaction de Guillain, Laroche et Léchelle avec le liquide céphalo-rachidien. Le meilleur moyen de s'assurer qu'on est en présence d'une bonne origine de benjoin est de l'éprouver en présence d'un sérum sûrement syphilitique.

b) Il faut, lorsqu'on emploie, soit une nouvelle préparation d'antigène de Bordet-Ruelens, soit une nouvelle teinture de

benjoin (ce qui n'arrive pas souvent, ces produits se conservant longtemps), — *rechercher le seuil de flocculation du mélange initial.*

Lors de nos premiers essais, la proportion à établir entre la quantité de benjoin et la quantité d'antigène de Bordet-Ruelens avait spécialement retenu notre attention. En effet, s'il y a trop de benjoin, l'émulsion flocale d'elle-même, et s'il n'y en a pas assez, la réaction perd de sa netteté. Nos essais nous ont donné les résultats suivants : 1^o les mélanges 1/1, 1/2, 1/3, 1/4 (1 étant le benjoin et 1, 2, 3, 4, l'antigène Bordet-Ruelens) flocculent dès qu'ils sont mis en présence de l'eau physiologique (ou de l'eau distillée); 2^o les mélanges 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10 ne flocculent pas d'eux-mêmes, mais à partir de 1/9 les flocculats sont plus fins et la réaction est moins apparente. Dans nos expériences, 1/5 est le premier qui ne floccule pas; nous le considérons comme le seuil de flocculation, mais, comme il est fort près de la limite, nous avons pris pour notre technique de réaction le taux de 1/6 qui s'est montré régulièrement exact avec toutes les origines d'antigène de Bordet-Ruelens (nous en avons essayé 12) ou de teinture de benjoin (nous en avons essayé 6). Mais, nous le répétons, il est avantageux de chercher pour chaque mélange initial le seuil de flocculation et de prendre pour la réaction définitive le chiffre immédiatement supérieur à celui qui marque le seuil.

c) Il faut éprouver le mélange initial en présence de sérums syphilitiques, de même qu'il faut éprouver tout nouvel antigène avant de pratiquer avec lui la réaction de Wassermann. Il faut aussi répéter cette vérification tous les deux mois par exemple, car les antigènes peuvent baisser. Ce sont là des faits bien connus de tous ceux qui s'occupent de sérologie.

2^o a) Le chauffage des sérums à 55° n'est pas indispensable, mais, à l'usage, il nous est apparu que la flocculation est plus rapide avec des sérums chauffés.

b) La lecture de la flocculation est très facile. On distingue aisément trois stades : flocculation à grains fins (F+), flocculation à gros grains (F++) et dépôt des flocculats au fond du tube avec liquide clair surnageant (FT). Nous les distinguons parce que, s'il est vrai que les sérums fortement positifs (syphili-

tiques récents, jamais traités) passent successivement par ces trois stades et si, de ce fait, on n'a à retenir que le dernier, d'autres sérum (syphilitiques anciens ou traités) s'arrêtent à l'un des premiers stades et on peut ainsi établir une classification.

Nous considérons comme positif tout sérum qui donne au bout de cinq heures une flocculation, au moins à petits grains. Mais la plupart des sérum positifs flocculent en moins de temps (beaucoup en une heure ou deux, flocculation à gros grains). Il existe des flocculations retardées qui n'apparaissent qu'au bout de dix, quinze, dix-huit ou vingt-quatre heures. Nous ne les donnons pas comme positives, mais nous les indiquons aux cliniciens parce que, jusqu'ici, *toutes* celles que nous avons constatées ont été obtenues avec des sérum de syphilitiques en traitement et que cette indication peut être utile.

Enfin on peut, après quatre heures d'étuve à 37°, laisser les tubes à la température du laboratoire. La lecture est encore plus nette.

c) Il faut faire un témoin en mettant en présence de l'émulsion un sérum normal. Ce sérum peut être *quelconque*, pourvu qu'il ne soit pas syphilitique (sérum humain, sérum normal de cheval, sérum thérapeutique, etc.). Car un fait nous a paru très digne d'attention et de nature à rassurer sur la possibilité de fausses flocculations avec notre technique. Lorsqu'on ajoute un sérum négatif aux mélanges qui flocculent spontanément, on voit, après mise à l'étuve et temps variable suivant la dose, le mélange *redevenir homogène* à la condition qu'on ne soit pas trop près d'une forte dose de benjoin : par exemple le phénomène se produit avec 1/4 et 1/3, quelquefois avec 1/2, jamais jusqu'ici avec 1/1.

Ce phénomène est net et constant.

III. — Résultats.

Nous ne donnerons que des résultats relatifs aux sérum sanguins ; la réaction marche aussi bien avec le liquide céphalo-rachidien, mais nous ne voyons pas d'avantages à la substituer à l'excellente méthode de MM. Guillain, Laroche et Léchelle.

1^o RÉSULTATS COMPARATIFS AVEC LES DONNÉES CLINIQUES ET AVEC LES RÉACTIONS DE LEVADITI ET DE WASSERMANN.

Nous avons examiné un nombre important de sérum, mais nous n'en avons retenu que 200 pour nos conclusions, car dans ces cas seulement nous possédions l'histoire clinique de la maladie.

Dans *tous* les cas où, cliniquement, il n'existant ni signes, ni stigmates de syphilis (tuberculose, mycoses, cancer, troubles digestifs, gonococcies, affections diverses, syphilophobes), la réaction de flocculation a été négative (50 cas).

Dans tous les cas où il existait cliniquement des signes certains de syphilis chez des malades non traités (chancres dont plusieurs amygdaliens en voie de disparition, roséole, aortites, syphilis nerveuses, syphilis tertiaires *jamais traitées*), la réaction de flocculation a été positive, en concordance avec la réaction de Wassermann (80 cas).

Mais, où les résultats diffèrent, c'est lorsqu'il s'agit de malades en traitement (70 cas).

Lorsque le traitement a été peu intensif ou de courte durée, les résultats concordent à peu près : Levaditi, 24; Wassermann, 22; flocculation, 20. Il semble qu'une mention spéciale doive être faite pour les malades traités par le bismuth : chez dix malades qui avaient reçu des doses de sels de bismuth, variant de 12 à 30 injections intramusculaires de ce médicament, et qui conservaient une réaction de Wassermann positive, la flocculation (positive avant le traitement) était, dans 8 cas, devenue franchement négative. Enfin, dans 36 cas encore positifs au Levaditi et qui étaient relatifs à des malades bien traités, la flocculation n'a donné de résultats positifs que dans 29 cas, et presque toujours elle s'arrêtait au premier stade (F +).

Notons enfin que la réaction dont nous avons donné la technique paraît positive avec le sérum des malades d'une façon plus précoce que la réaction de Wassermann. Enfin, dans un petit nombre de cas (4), la réaction de flocculation restait positive alors que la réaction de Wassermann était négative.

Divers expérimentateurs ont eu l'amabilité d'essayer notre méthode et de nous communiquer leurs résultats ; ils concordent

avec les nôtres. Certains ont trouvé un pourcentage un peu plus élevé de cas positifs ; l'un de ces expérimentateurs, qui a essayé la méthode dans une centaine de cas, nous dit qu'elle n'est pas plus sensible que la méthode de Wassermann et nous sommes heureux de pouvoir nous expliquer sur ce point. Nous ne revendiquons pas pour la technique que nous avons indiquée une sensibilité plus grande que celle de la réaction de Wassermann, mais nous retenons sa grande simplicité et, comme nous allons l'indiquer, le fait qu'elle doit venir à l'appui de la réaction de Wassermann.

2^o La comparaison des constatations cliniques et des résultats obtenus par notre méthode comparativement à d'autres nous avait fait penser, en effet, que cette réaction de flocculation fournit des indications quelque peu différentes de celles que donne la méthode de Wassermann.

Avec des sérums de malades porteurs de lésions syphilitiques nettes, sérums donnant une réaction de Wassermann positive et flocculant fortement, nous avons fait l'expérience suivante : un sérum est soumis à la flocculation en présence du mélange initial (Bordet 5, benjoin 1) pendant vingt-quatre heures. Au bout de ce temps la totalité du liquide est centrifugée et le liquide surnageant est remis pendant vingt-quatre heures en présence d'une nouvelle provision d'antigène Bordet + benjoin. Le pouvoir flocculant est épuisé. On centrifuge de nouveau et le liquide surnageant sert à pratiquer une réaction de Wassermann classique. Il faut tenir compte, bien entendu, quand on pratique cette réaction de Wassermann, du fait que le sérum sanguin a été dilué au 1/6 au moment de sa mise en contact avec l'émulsion dans l'eau physiologique du mélange antigène Bordet + benjoin et en mettre la quantité nécessaire. Huit fois, sur 10 cas étudiés, les sérums dont le pouvoir flocculant avait été ainsi épuisé ont donné une réaction de Wassermann positive.

Au contraire, avec des sérums ainsi traités (et qui, bien entendu, n'avaient pas été préalablement chauffés), nous n'avons pas obtenu de résultats avec la réaction de Levaditi, car, même après l'addition de complément, ou de complément et de sensibilisatrice, il ne se produisait d'hémolyse dans aucun tube, même après un temps fort long.

IV. — Conclusions.

La réaction dont nous avons indiqué la technique met en évidence une curieuse propriété optique du serum sanguin syphilitique.

L'addition de benjoin *rend macroscopique*, facile à lire à l'œil nu, une flocculation dont la constatation demanderait une installation optique importante.

La grande simplicité de cette réaction peut en faire une méthode précieuse pour certains laboratoires.

Enfin, et c'est sur ce point que nous désirons insister, il ne s'agit pas de la substituer à la réaction de Wassermann, mais nous pensons que les cliniciens auraient intérêt à s'aider des renseignements donnés par les *deux* méthodes.

(*Service du Dr L. Martin.*)

MICROBES ET VITAMINES

par P. GOY.

(*Travail de l'Institut national agronomique,
Laboratoire de M. Kayser, et de l'Institut Pasteur,
Laboratoire de M. Weinberg.*)

Les premières expériences sur le rôle des vitamines ont tout d'abord porté sur les animaux supérieurs. Ces recherches soulevèrent bientôt des problèmes de biologie végétale, et, en particulier, de microbiologie.

Actuellement, deux aspects du problème des vitamines attirent l'attention du bactériologue : d'une part, l'action de ces facteurs sur la croissance des cultures microbiennes, et, d'autre part, leur élaboration possible par les microbes eux-mêmes.

La notion des « bios », née des travaux de Wildiers [1], a mis en évidence, dès 1901, la nécessité pour le développement de certains microbes en milieu minéral, de l'apport de substances organiques élaborées par les êtres vivants.

Des recherches plus précises, et inspirées directement des travaux sur les vitamines, furent effectuées en 1915 par Bottomley [2], d'une part, et F. Mockridge [3], de l'autre. En cultivant certains végétaux, et, en particulier, *Lemma minor*, sur solution de Detmer, additionnée ou non d'extrait alcoolique de tourbe de sphagnum fermentée, Bottomley s'aperçut de l'action très favorisante de cet extrait. En précipitant celui-ci à l'aide de l'acide phosphotungstique, de la baryte et du nitrate d'argent, il obtint un corps actif, même à la dose de 0,33/1.000.000, et résistant aux hautes températures.

A l'aide de la même méthode, Mockridge montra que cette action favorisante s'appliquait aussi aux monocellulaires tels que le *B. radicicola*.

Ces nouvelles données eurent une inévitable répercussion sur la technique microbiologique. C'est ainsi qu'en 1918, Hun-

toon [4], s'inspirant des travaux de Llloyd sur l'extraction des vitamines, proposa un nouveau milieu de culture dans lequel il faisait entrer du cœur de bœuf haché et des œufs complets, milieu qui ne devait ni être stérilisé à plus de 100°, ni filtré sur ouate ou papier. Quelque temps après, Agulhon et Legroux [5] préconisèrent l'emploi d'extrait aqueux globulaire pour la culture du B. de Pfeiffer, et insistèrent, eux aussi, sur la nécessité de ne pas dépasser, à la stérilisation, une température voisine de 100°. Cet extrait, d'après Legroux et Mesnard [6], est détruit par les alcalis, même à faible dose, alors qu'il n'est pas influencé par les acides forts; il dyalise à travers le par-chemin et le collodion et résiste aussi à la dessiccation.

Cultivant comparativement des paramécies en lait au malt, additionné d'extrait de riz décortiqué ou non, Flather [7] a constaté que les infusoires proliféraient beaucoup mieux en milieu à base de grain entier. Linossier [8] montra que l'*Oidium lactis*, ensemencé en milieu minéral, bénéficiait considérablement de corps d'origine végétale (extrait de raisins secs) ou bien encore de l'apport de petites quantités d'une culture du même oïdium sur milieu identique. Ces substances favorisantes supportent, suivant l'auteur, de hautes températures (135°); toutefois, ainsi chauffées, elles perdraient une partie de leur action vis-à-vis de semences vieillies ou éprouvées par la chaleur.

A la suite d'une série de travaux, Williams [9] préconise l'emploi de certaines levures dans la recherche et le dosage des vitamines. Ces levures seraient incapables de proliférer en leur absence et donneraient selon lui des résultats superposables à ceux fournis par les animaux (méthode d'Osborn et Mandel).

Funck et Dubin [10] parviennent, eux aussi, à influencer favorablement le développement de saccharomyces et de streptocoques par l'emploi de diverses substances, mais ils démontrent, en éliminant le facteur B, à l'aide de la terre à foulon, qu'il s'agit, contrairement à l'opinion de Williams, d'un facteur différent, dénommé par eux « vitamine D ».

On s'est également demandé si les microbes eux-mêmes étaient capables d'élaborer des vitamines. Abordant ce problème, Wollmann [11] montre à l'aile d'animaux avitaminés

que ni l'*Amylomucor* β cultivé sur riz glacé, ni le *B. bulgare* en lait stérilisé ne sont capables d'engendrer les facteurs B et C. Il en est de même, d'après Damon [12], pour le *B. coli*, le *B. typhique* et *paratyphique*. Cependant, ce dernier cite, dans un travail plus récent, quelques expériences sur le rat qui montrent que le *B. de Pfeiffer* et un bacille acido-résistant élaborent la vitamine B.

Dans un travail critique, publié en 1921, A. Lumière [13] a repris l'étude des propriétés des facteurs agissant sur la vie microbienne. Pour lui : 1^o ceux-ci ne jouent un rôle que dans les cas où le milieu de culture employé est pauvre, et dans ce cas seulement; 2^o Ils se différencient des vitamines indispensables aux animaux supérieurs par leur insensibilité à la chaleur, leur non-précipitation par les réactifs des alcaloïdes, leur non-absorption par la terre à soulon, enfin par leur réaction différente vis-à-vis du réactif de Lloyd.

Nous avons commencé nos recherches sur les vitamines dès 1919 ; nous étudions alors la culture des végétaux inférieurs, en milieu synthétique. Nous avons été ainsi amené à constater l'influence des facteurs accessoires, à doses infinitésimales, sur la croissance de ces êtres, et, en particulier, de la levure. Puis nos recherches se sont étendues au *Mucor*, à l'*Aspergillus*, et enfin aux bactéries en général.

Un certain nombre des faits observés par nous ont été déjà signalés à l'Académie des Sciences, à la Société de Biologie et dans notre thèse de doctorat ès sciences [14]. Nous allons résumer dans ce mémoire les principales données de nos recherches antérieures en y ajoutant l'exposé de quelques faits nouveaux.

A. — ACTION DE L'EXTRAIT DE *Mucor mucedo* SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'*Aspergillus niger*.

Certains végétaux inférieurs se développent bien en milieux minéraux, tels l'*Aspergillus niger* sur liquide de Raulin, le *Mucor mucedo*, l'*Amylomucor* β en solution de Mayer; cependant, ces organismes bénéficient notablement d'un apport, même minime, de corps organiques tels que : filtrats de cultures microbiennes, extraits de fruits, de légumes, d'organes, etc., comme le montre l'expérience suivante :

TABLEAU I.

Cultures d'*Aspergillus niger* ensemencées au fil en milieu de Raulin avec et sans adjonction de filtrat de culture de *Mucor*.

MILIEUX	AGE des cultures en heures	POIDS de vég. tali sec en grammes
1 ^o 100 cent. cubes de liquide de Raulin pur (témoin).	60	0,605
2 ^o 100 cent. cubes de liquide de Raulin pur (témoin).	130	1,990
3 ^o 100 cent. cubes de liquide de Raulin + 3 p. 100 de filtrat chauffé de culture de <i>Mucor mucredo</i> sur le même milieu.	60	1,900
4 ^o 100 cent. cubes de liquide de Raulin + 3 p. 100 de filtrat chauffé de culture de <i>Mucor mucredo</i> sur le même milieu.	130	1,905

Ainsi, l'*Aspergillus niger*, ensemencé en milieu de Raulin additionné d'une substance favorisante, a donné, en soixante heures, une culture en poids sensiblement égale à celle obtenue en milieu de Raulin pur dans un temps beaucoup plus long (cent trente heures).

B. — ACTION FAVORISANTE DE L'EXTRAIT DE L'*Amylomucor* β (DELEMAR) SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA LEVURE DE BRASSERIE.

Quelques végétaux monocellulaires, comme certaines levures de brasserie, ensemencés au fil de platine, ne peuvent proliférer en milieux synthétiques qu'à la condition d'y rencontrer un hydrate de carbone non purifié, ou, à défaut, une très petite quantité de substances provenant du métabolisme de cellules homologues ou non (cultures, extraits, sécrétions).

Il est bon de noter que les cultures microbiennes dont on veut se servir comme facteur favorisant doivent être, ou filtrées sur bougie, ou, de préférence, chauffées à 85-90°. Ce traitement a probablement pour effet de les débarrasser des bactériolyses non spécifiques qu'elles contiennent.

Voici, à titre d'exemple, le protocole d'une expérience que nous avons maintes fois reproduite :

TABLEAU II. — Cultures de *Saccharomyces cerevisiae* (six jours à 27°) en liquide de Mayer.

MILIEUX,	ACIDE total en SO ⁴ H ²	ALCOOL p. 100	POIDS de levure à l'état sec p. 100	NUMÉRATION (moyenne par champ)
1 ^o Solution de Mayer avec saccharose pur		Aucun développement.		
2 ^o Solution de Mayer + 1 p. 100 de culture centrifugée d'Amylomucor β (Delemar) sur Meyer	0,014	0°710	10	12
3 ^o Solution de Mayer + 1 p. 100 de la même culture filtrée sur bougie L2	0,099	2°95	60	98
4 ^o Solution de Mayer + 1 p. 100 de la même culture autoclavée dix minutes à 110° . . .	0,230	4°010	85	121

Il est évident que le chauffage est préférable à la filtration.

L'action de ces substances favorisantes, que nous avons extraites des cultures de l'Amylomucor β (Delemar) et qui se manifeste à doses infinitésimales, rappelle celle des vitamines.

Cette vitamine est-elle précisément le facteur B indispensable au développement des animaux supérieurs?

Il suffit, pour répondre à cette question, de rapprocher les résultats obtenus par la Commission anglaise [45] qui a étudié la présence de ce facteur dans divers aliments, de ceux auxquels nous sommes arrivé après avoir recherché, dans les mêmes catégories d'aliments, la substance favorisant la culture de la levure en milieu minéral.

Nous avons résumé, dans la première partie du tableau ci-dessous, les données obtenues par cette Commission en joignant, à la quatrième colonne, les résultats de nos recherches personnelles.

Les résultats que nous avons obtenus ne sont nullement superposables à ceux de la Commission britannique, car si les extraits d'œufs frais ou de levures sèches par exemple, contiennent à la fois le facteur B en abondance et une vitamine des plus active pour la levure, par contre l'extrait de viande ou le riz poli se sont montrés dépourvus de tout facteur de croissance nécessaire aux animaux supérieurs et néanmoins actifs vis-à-vis des saccharomyces.

TABLEAU III.

	FACTEUR A	FACTEUR B	FACTEUR C	POIDS de levure obtenu comparati- vement
Œuf frais	++	+++	douteux	2,5
Lait de vache non écrémé	++	+	+	2,8
Levures sèches	"	+++	"	3,2
Jus de citron frais	"	"	+++	2,9
Jus d'orange frais	"	"	+++	3,1
Maïs (grain entier)	+	+	0	2,9
Riz poli	0	0	0	2,3
Extrait de viande.	"	0	0	2,8
Sang de jeune cobaye neuf âgé de un an et nourri normalement.				2,9
Sang de jeune cobaye neuf, mort d'avitaminose expérimentale par nourriture autoclavée				2,8
Extrait éthéré de blanc d'œuf				2,6
Jus de citron stérilisé une heure trente à 130°				3
Filtrat de culture microbienne (Amylomucor β Delemar) nette- ment alcalinisé et porté une heure trente à 130°				3

Les signes + donnent la richesse comparative des divers facteurs accessoires trouvés dans quelques aliments. Les chiffres indiquent le poids des cultures de levure que nous avons obtenu par l'adjonction des mêmes complexes au milieu de Mayer en quantité fort minime et comparable. Il est entendu que les milieux témoins (liquide de Mayer pur) ensemencés avec la même levure n'ont pas donné de culture.

Il est donc évident que le facteur favorisant la culture de la levure, extrait par nous de l'Amylomucor β (Delemar), n'est pas identique au facteur B. Cette conclusion est appuyée par l'observation de Wollmann qui a constaté, au moyen de l'expérimentation sur les animaux supérieurs, que la culture de l'Amylomucor β ne renferme pas ce facteur.

D'ailleurs d'autres faits viennent confirmer cette manière de voir. Les vitamines A, B, C ne supportent pas le chauffage à haute température ; or, le facteur que nous avons utilisé n'est pas détruit, même par le chauffage de 1 h. 30 à 130°, comme le montrent nos recherches pratiquées avec l'extrait alcoolique de blé et de riz décortiqué.

TABLEAU IV. — Action comparative de l'extrait alcoolique de blé entier et de riz décortiqué sur le développement d'une levure de brasserie ensemencée au fil de platine en milieu minéral.

	QUANTITÉ d'extrait	
1 ^o Liquide de Mayer avec saccharose, purifié (témoin) . . .		Aucun développement.
2 ^o 50 cent. cubes de liquide de Mayer + extraction de 20 gr. de riz décortiqué dans 30 cent. cubes d'alcool à 90° pendant dix-huit heures.	{ 0,3 0,6 0,9 2	Après cinq jours de culture à 27°, nous n'avons pas trouvé de différence macroscopique dans les dépôts de levure, ceux avec extraction de riz correspondant sensiblement à ceux contenant l'extraction de blé.
3 ^o 50 cent. cubes de liquide de Mayer + extraction de 20 gr. de blé entier dans 30 cent. cubes d'alcool à 90° pendant dix-huit heures.	{ 0,3 0,6 0,9 2	

La richesse de la culture est en fonction de la quantité d'extrait ajouté.

Le tableau IV montre que ces deux extraits favorisent la culture de la levure. Or nous avons obtenu à peu près les mêmes résultats en opérant (tableau V) avec les mêmes extraits chauffés.

TABLEAU V.

Action comparative de l'extraction alcoolique de blé entier chauffé deux minutes à 120° et une heure trente à 130°.

	QUANTITÉ d'extrait	
1 ^o Liquide de Mayer avec saccharose purifié (témoin) . . .		Aucun développement.
2 ^o Liquide de Mayer + extrait alcoolique de blé chauffé deux minutes à 120°	{ 0,2 0,6	Après sept jours de culture à 27°, nous n'avons pas trouvé de différence macroscopique dans les dépôts de levure, tous les tubes ayant également poussé.
3 ^o Liquide de Mayer + extrait alcoolique de blé chauffé une heure trente à 130°.	{ 0,2 0,6	

Par contre, le radium exerce une action manifeste sur le pouvoir activant du facteur accessoire, comme le montre le tableau ci-après :

TABLEAU VI. — **Influence des radiations du radium sur le pouvoir activant du facteur accessoire de la croissance des levures.**

4 tubes contenant chacun 10 cent. cubes d'un filtrat de culture de mucor furent exposés à l'irradiation suivante :

	POIDS de Ra utilisé en milligrammes	TEMPS d'exposition en heures
Tube A	0,050	24
Tube B	0,050	73,30
Tube C	0,100	73,30
Tube D	0,400	24

Les conditions de l'expérience étaient telles qu'un centigramme de radium nous donnait en vingt-quatre heures un millicurie.

Cultures de S. cerevisiae.

	PRODUCTION d'alcool p. 100	POIDS DE VÉGÉTAL par 100 cent. cubes		NUMÉRATION moyenne par champ
		à l'état sec	par rapport au témoin	
1 ^o Liquide de Mayer (sucrose ordinaire) témoin	20000	19	—	28
2 ^o Liquide de Mayer + 0 c. c. 5 p. 100 de culture de Mucor mucedo non traitée par le radium	30902	68	+ 49	139
3 ^o Liquide de Mayer + 0 c. c. 5 p. 100 de D	30410	67	+ 48	132
4 ^o Liquide de Mayer + 0 c. c. 5 p. 100 de B	40601	30	+ 21	110
5 ^o Liquide de Mayer + 0 c. c. 5 p. 100 de A	40226	48	— 29	92
6 ^o Liquide de Mayer + 0 c. c. 5 p. 100 de C	20305	25	+ 6	37

En conclusion, le radium détruit le pouvoir accélérateur du filtrat de *Mucor*.

Il était intéressant de rechercher si notre extrait pouvait agir en milieu de Mayer privé de certains sels minéraux. L'expérience résumée plus bas indique que cet extrait ne peut influencer la culture de levure qu'en présence de tous les sels composant ce liquide.

TABLEAU VII.

	SOLUTION MINÉRALE pure	SOLUTION MINÉRALE + 2 p. 100 d'extrait éthéré
1 ^o Liquide de Mayer (témoin).	Aucun développement.	42 milligr. p. 100 c. c.
2 ^o Liquide de Mayer sans Mg.	Aucun développement.	0 développement.
3 ^o Liquide de Mayer sans Ca	Aucun développement.	Culture très faible.
4 ^o Liquide de Mayer sans K.	Aucun développement.	Culture insignifiante.
5 ^o Liquide de Mayer sans P.	Aucun développement.	Culture insignifiante.

Enfin, comme le prouve le tableau VIII, le facteur accélérant le développement des levures en milieu minéral ne se trouve pas dans la gélatine employée ordinairement dans les laboratoires de microbiologie.

TABLEAU VIII.

1 ^o Liquide de Mayer (témoin)	Aucun développement.
2 ^o Liquide de Mayer + 1 p. 100 de gélatine.	Aucun développement.
3 ^o Liquide de Mayer + 4 p. 100 de gélatine.	Aucun développement.
4 ^o Liquide de Mayer + 4 p. 100 de gélatine + extrait de <i>Mucor</i>	Développement.

Ce dernier fait nous montre donc que l'état colloïdal du milieu n'exerce pas d'influence sur le développement de la levure en présence de l'extrait de *Mucor*; et que, d'autre part, l'état colloïdal seul ne peut expliquer le phénomène accélérateur.

C. — ACTION DU FILTRAT DE L'AMYLOMUCOR β SUR LE DÉVELOPPEMENT DES CULTURES MICROBIENNES.

Ayant étendu nos recherches aux microbes pathogènes de l'homme, nous avons constaté que certains d'entre eux, ensemencés comparativement avec ou sans extrait d'amylo mucor, donnaient plus de résultats positifs dans les premiers milieux. De plus, l'amorçage des cultures était plus rapide lorsque celles-ci avaient poussé en présence de filtrat.

En voici un exemple : le *Bacillus histolyticus* est ensemencé comparativement sur bouillon additionné ou non de filtrat (1); on verse, dans chaque tube, une goutte de semence microbienne

(1) Culture de *Mucor* sur bouillon glucosé à 5 p. 100 (treize jours à 27°).

et on porte le tout à l'éluve à 37°. Au bout de quatorze heures, on ne constate aucun développement dans le milieu simple, alors que l'on trouve, en moyenne, 31 microbes par champ microscopique dans la jeune culture obtenue à l'aide du filtrat; au bout de dix-neuf heures apparaît un trouble dans le milieu témoin (bouillon simple) où l'on compte 31 microbes par champ, alors que la culture avec filtrat en présente déjà 97. De même pour le Streptocoque : trois souches de cette espèce sont ensemencées simultanément en boîtes de Pétri; avec et sans facteur accélérateur. Tandis que, dans les boîtes de la première série, les cultures apparaissent nettement au bout de la dix-septième heure, à 37°, celles de la seconde série n'offrent encore aucun développement. On conçoit facilement l'importance de pareils faits pour le diagnostic bactériologique précoce de la flore des plaies.

Ce développement rapide a été également constaté pour d'autres microbes : *Staphylocoque*, *streptocoque*, *V. cholérique*, *B. de Shiga*, *B. diphtérique*, *B. perfringens*, *V. septique*, *B. tétanique*, *B. sporogenes*, *B. tuberculeux*.

Le bacille diphtérique est ensemencé soit sur gélose inclinée, soit sur sérum coagulé. Pour additionner le sérum coagulé de la substance favorisante, nous avons tout simplement répandu à sa surface quelques gouttes de filtrat de *Mucor*. Quant à la gélose, le filtrat a été incorporé au moment de la préparation, avant la stérilisation définitive du milieu de culture.

L'action très nette de la substance accélératrice sur le *B. sporogenes* et le *B. histolyticus* montre qu'elle agit aussi bien sur les espèces protéolytiques que sur les non-protéolytiques.

Cette substance ne favorise le développement du *B. de Koch* sur milieu de Pétrroff qu'à la condition d'y avoir été adjointe avant la coagulation de l'albumine.

Il est intéressant de remarquer que, si l'amorçage de la culture est nettement favorisé par notre filtrat, son poids total définitif ne diffère pas sensiblement des cultures témoins parties beaucoup plus tard. Il est donc évident que l'action du filtrat sera d'autant plus démonstrative, qu'il s'agira d'espèces microbiennes à évolution lente ou d'ensemencements pratiqués avec une quantité minime de germes.

L'addition d'extrait de *Mucor* aux milieux de culture ne change en rien la morphologie, la colorabilité, la pigmentation (*B. pyocyanique*) ni les caractères culturaux des microbes ense-
mencés.

Disons en terminant que nos recherches, pratiquées sur le *B. histolyticus*, nous ont amené à cette conclusion que le filtrat de *Mucor* n'a pas d'action sur le pouvoir toxigène ni sur la virulence de ce microbe.

D. — CARACTÈRES PHYSIQUES ET CHIMIQUES
DU FACTEUR FAVORISANT.

Le principe actif que nous avons isolé des cultures de *Mucor*, et dont nous avons constaté l'effet favorisant sur la levure, présente les caractères suivants :

1. Dialyse sur parchemin, papier parcheminé et collodium ;
2. Est soluble dans l'eau, l'alcool, l'éther ;
3. En solution éthérée, n'est pas précipité par l'acide phosphotungstique ;
4. Son activité n'est pas en rapport avec la quantité d'acides aminés trouvés dans la culture ;
5. Résiste à la chaleur (chauffage de une heure trente à 130°) en solution acide, neutre ou alcaline, aussi bien qu'au froid (vingt-quatre heures à —22°) ;
6. Se conserve plusieurs mois à la température ordinaire ;
7. Est sensible à l'action du radium.

Il a certains points communs avec la vitamine B.

1. Nature organique ;
2. Action à dose infinitésimale ;
3. Nécessité d'un couvert minéral entier pour agir efficacement ;
4. Solubilité dans l'eau et l'alcool ;
5. Destructibilité par le radium ;
6. Absence dans la gélatine.

Mais il en diffère par les caractères suivants :

1. Grande résistance à la chaleur, même en milieu alcalin (3 gr. 40 en KOH) ;
2. Présence dans le grain de riz décortiqué, ainsi que dans

certaines cultures de mucédinées comme celles de l'*Amylomucor* β ;

3. Filtration possible sur terre à foulon ;
4. Entière solubilité dans l'éther.

CONCLUSIONS.

Il existe dans la culture de l'*Amylomucor* β (Delemar) une substance qui favorise le développement des levures et des microbes en général.

Ce facteur de croissance est différent de la vitamine B avec laquelle il se trouve quelquefois associé dans certains produits du métabolisme vital.

On peut employer avantageusement cette nouvelle vitamine dans la préparation de milieux de culture propices à la croissance rapide de certains microbes à développement lent comme, par exemple, le *Streptocoque*.

La résistance considérable de ce facteur accessoire aux hautes températures (1 h. 30 à 130°) différencie nettement les vitamines d'origine végétale des vitamines d'origine animale, qui ne conservent pas leur pouvoir favorisant après un chauffage à 100°.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]. WILDIERS. *La Cellule*, **18**, 1901, p. 313.
- [2]. W. BOTTOMLEY. *Proc. Royal Soc.*, B, **89**.
- [3]. F. MOCKRIDGE. *Proc. Royal Soc.*, **89**.
- [4]. F. HUNTOON. *Journ. of Infect.*, **10**, 23 août 1918.
- [5]. H. AGULHON et R. LEGROUX. *C. R. Acad. des Sc.*, **87**, octobre 1918.
- [6]. LEGROUX et MESNARD, Vitamines pour la culture des bactéries. *C. R. Acad. des Sc.*, **160**, 12 avril 1920.
- [7]. M. D. FLATHER, Action du riz décortiqué et du riz non décortiqué sur le métabolisme des paraméries. *Bull. Biol.*, **36**, janvier 1919.
- [8]. G. LINOSSIER, Les vitamines et les champignons. *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, avril 1919, et *C. R. Soc. de Biol.*, 1920.
- [9]. R. J. WILLIAMS, Méthode de détermination quantitative des vitamines. *Journ. Biol. Chim.*, **42**, 1920; Vitamines et croissance de la levure. *Journ. Biol. Chim.*, **46**, 1921; Les besoins de la levure en ce qui concerne les vitamines. *Journ. Biol. Chim.*, **48**, juillet 1919.
- [10]. C. FUNCK et H. DUBIS. *Journ. Biol. Chim.*, **48**, 1921.

- [41]. E. WOLLMANN, Élevage aseptique de larves de mouches à viande sur milieu stérilisé à haute température. *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, 1919 ; Larves de mouches et vitamines. *C. R. Soc. de Biol.*, **72**; Sur le rôle des micro-organismes dans la production des vitamines. *C. R. Soc. de Biol.*, **85**, 1921.
- [42]. S. R. DAMON, Les bactéries comme source de vitamines B solubles dans l'eau. *Journ. Biol. Chim.*, **48**, 1921.
- [43]. A. LUMIÈRE. *Ces Annales*, **35**, 1921.
- [44]. P. GOY, Les végétaux inférieurs et les facteurs accessoires de la croissance. *C. R. Acad. des Sc.*, **172**, 1921; Les facteurs accessoires de la croissance chez les végétaux inférieurs (*Thèse doctorat*). Faculté des Sciences, Paris; Physiologie microbienne et facteurs accessoires de la croissance. *C. R. Acad. des Sc.*, **174**, 1922; Action du filtrat de *Mucor* sur le développement des cultures microbiennes. *C. R. Soc. de Biol.*, **87**, 1922.
- [45]. Report on the present state of knowledge concerning accessory food factors (vitamines), *Special Report Series*, n° 38, Londres, 1919.
- [46]. S. R. DAMON, Quelques observations sur les substances d'origine bactérienne favorisant la croissance. *Journ. of Bacter. Chem.*, **56**, p. 894.

Le Gérant : G. MASSON.

